UNIVERSITY O
LIBRAR
JUL 21

EXPERIENTIA

EST EXPERIENTIA SCIENTIA PARACELSUS

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:
A.v.MURALT · L.RUZICKA · J.WEIGLE
Bern Zürich Genève
Redactor: H.MISLIN, Basel

VERLAG BIRKHÄUSER AG. · BASEL 10
SUISSE - SCHWEIZ - SVIZZERA - SWITZERLAND

Vol. VI. – Fasc. 6 15. VI. 1950 Fr. 2.50

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

E. CHARGAFF: Chemical Specificity of Nucleic Acids and Mechanism of their Enzymatic Degradation 201
K. v. FRISCH: Die Sonne als Kompaß im Leben der Bienen 210

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

M. G. VIGUIER: L'oscillateur harmonique à *n* dimensions 222
H. BIERI: Ein isoperimetrisches Problem mit Nebenbedingung 222
H. STAMMREICH: Das Raman-Spektrum des Azobenzols 224
K. MÜHLETHALER: An Electron Microscopic Study of the Structure of Viscose Silk 226
CH. WUNDERLY: Die Elution von Fettfarbstoffen durch Albumin und Polyvinylpyrrolidon 228
E. CHARGAFF, CELIA LEVINE, CHARLOTTE GREEN, and J. KREAM: Study of Some Constituents of Vitamin B_{12} . . . 229
G. ASTALDI and JENNY FRANKO: Studies on the Possibility of Using Protamin Sulfate in the Technique of *in vitro* Cultures of Hematopoietic Tissues 231
CH. LANDSCHÜTZ: Zytochemischer Nachweis der Adenosintriphosphatase (ATP-ase) in den Zellen des Ascitestumors der Maus 232
H. BRAUNSTEINER und F. MLCZOCH: Über den Einfluß des α-Tocopherols auf den Stoffwechsel 234
A. PAOLINI: Effetti degli alcaloidi diidrogenati del *secale cornutum* sugli edemi polmonari sperimentali da adrenalina, salicilato di metile e tiourea 234

Nouveaux livres - Buchbesprechungen - Recensioni - Reviews

Lezioni di geometria moderna, Vol. I. Di B. Segre (Zanichelli, Bologna, 1948) (Rel. A. Longhi) 236
Nuclear Forces. By L. Rosenfeld (North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1948) (Ref. M. Fierz) 236
Ins Innere von Kunststoffen, Kunstharzen und Kautschukarten. Von Erich V. Schmid (Verlag Birkhäuser, Basel 1949) (Ref. H. E. Fierz-David) 237
Traité de Zoologie. Publié sous la direction de M. Pierre Grasse (Masson et Cie., Paris 1948) (Ref. W. v. Buddenbrock) 237
Tratado de Fitopatología. Por Juan B. Marchionatto (Ediciones Librería de Colegio, Buenos Aires 1948) (Ref. W. Troll) 237

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

Studiorum progressus: R. B. Woodward and Gurbakhsh Singh: The Structure of Patulin 238
Congrès 240

Demnächst erscheint:

Grundriß zu einer Balneobiologie der Thermen

von V. VOUK

Professor an der Universität Zagreb

Diese Schrift ist von einem Biologen verfaßt und in erster Linie den Balneologen gewidmet. Der Verfasser hat sich längere Zeit mit den Problemen der Biologie der Thermen beschäftigt und dabei oft Gelegenheit gehabt, sowohl mit den Problemen der Balneologie als auch mit Balneologen und praktischen Ärzten in Kontakt zu treten. So gelang es dem Verfasser, die Heilkräfte der Thermalquellen zu erkunden und aus dem Komplex der verschiedenen wirksamen Faktoren diejenigen ausfindig zu machen, welche uns bis heute noch verborgen geblieben sind.

86 Seiten mit 22 Abb., Ganzleinen Fr. 11.50, broschiert Fr. 8.50

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung!

VERLAG BIRKHÄUSER BASEL

Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia VI/6

Sandoz AG., Basel	Spécia, Paris	Prometheus-Druck, Basel
Birkhäuser AG., Basel	E. Mettler, Zürich	Karl Kirchner AG., Bern
Ciba AG., Basel	Steiner & Co., Basel	Trüb, Täuber & Co. AG., Zürich

Die EXPERIENTIA kann in folgenden Ländern bei der Post abonniert werden:
EXPERIENTIA can be subscribed directly through any Post Office in the following countries:

Belgien-Luxemburg	Dänemark	Schweden	Portugal	Italien
Holland	Norwegen	Finnland	Marocco	Deutschland (ab 1. VII. 50).

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Prix du numéro fr. 2.50. Abonnement pour un an fr. 24.– pour la Suisse; pour l'étranger fr. 28.–. Ces prix s'entendent en francs suisses.

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Auslande durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. In Belgien, Luxemburg, Dänemark, Schweden, Norwegen, Finnland, Tschechoslowakei, Portugal und Marokko nehmen auch die Postämter Bestellungen entgegen.

Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 24.–, im Ausland sFr. 28.–; die Einzelnummer kostet Fr. 2.50.

Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 200.–, $^1/_2$ Seite Fr. 120.–, $^1/_4$ Seite Fr. 70.–. Inseratenannahme durch den Verlag.

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. Il prezzo del singolo fascicolo è di fr. 2.50. L'abbonamento annuo è di fr. 24.– per la Svizzera; all'estero fr. 28.–. I prezzi vanno intesi in valuta svizzera.

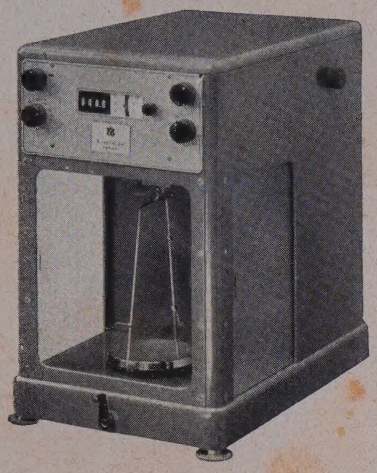
EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price per number is fr. 2.50, by annual subscription by inland-mail fr. 24.–; other countries fr. 28.–. Prices in Swiss currency.

Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 200.–, $^1/_2$ page fr. 120.–, $^1/_4$ page fr. 70.–. Advertisements should be sent to the publishers.

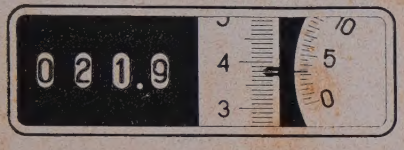
Verlag Birkhäuser AG., Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstraße 15
Tel. 49800; Telegrammadresse: Edita Basel

Printed in Switzerland by E. Birkhäuser & Cie. AG., Basel

METTLER Analysenwaagen



Sie lesen direkt ab:



genau
schnell
einfach
sicher

Gewicht: 21,93833

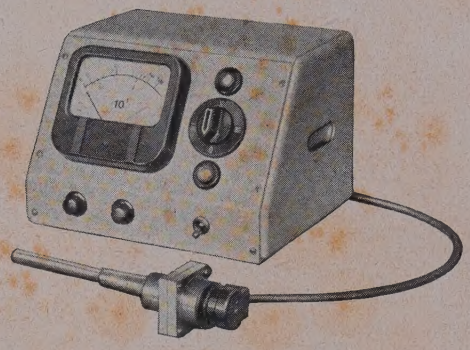
Verlangen Sie unverbindlich Offerte oder Demonstration

E. METTLER Fabrik für Analysenwaagen
ZÜRICH 1
Pelikanstr. 19, Tel. (051) 25 25 70

Gerätebau-Anstalt GAB **Balzers (FL.)**

Vakuum-Messgeräte

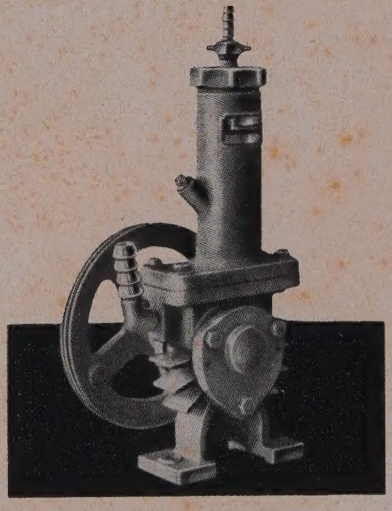
kontinuierlich anzeigend zwischen
10^{-5} bis 1 mm Hg



Vollkommen unempfindlich gegen Lufteinbrüche in eingeschaltetem Zustand. Einstellzeit max. 2 Sek. Eingebauter Umschalter für Anschluß von 4 Meßzellen, Gerät auch als „Leak-detector" verwendbar.

Verkaufsorganisation

Trüb, Täuber & Co. AG. Zürich
Fabrik elektr. Meßinstrumente und wissenschaftl. Apparate



Neuer

Labor-Kompressor und Vakuumpumpe

Überdruck: 2 atü Endvakuum: besser als 1 Torr

Verlangen Sie Offerte

KARL KIRCHNER AG., BERN
Freiestraße 12, Telephon (031) 24597

Neuerscheinung Juli 1950

W. von Buddenbrock

PROFESSOR DER ZOOLOGIE AN DER UNIVERSITÄT MAINZ

Vergleichende Physiologie

BAND IV

HORMONE

Die Bedeutung des vorliegenden Werks liegt darin, daß hier zum ersten Male der Versuch gewagt wird, die Hormone nicht vom medizinischen, sondern vom vergleichend physiologischen Standpunkt aus zu erfassen. Das Buch wendet sich daher in der Hauptsache an den Biologen, der sich bisher in den medizinischen Werken nur über den Menschen und einige wenige Haussäugetiere orientieren konnte. Die bunte Mannigfaltigkeit des Stoffes wird aber auch den Arzt interessieren, da gerade der Vergleich unterschiedlichen Verhaltens zu mannigfachen Gedanken anregt.

AUS DEM INHALT: Die Schilddrüse – Das Pankreas als innersekretorisches Organ – Das Nebennierenmark – Die Nebennierenrinde – Die Nebenschilddrüsen oder Epithelkörperchen – Der Thymus – Die Epiphyse – Die Sexualhormone – Die Hypophyse – Die Hormone der wirbellosen Tiere.

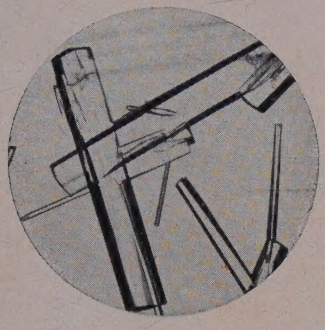
484 Seiten mit 115 Figuren und vielen Tafeln. In Ganzleinen Fr. 47.50, broschiert Fr. 43.50.

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung

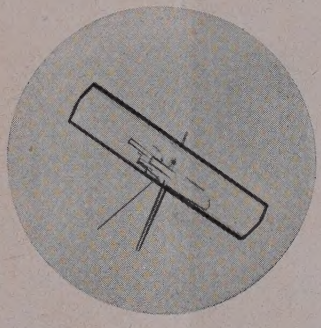
VERLAG BIRKHÄUSER BASEL (Schweiz)

Herzwirksame Glykoside Sandoz

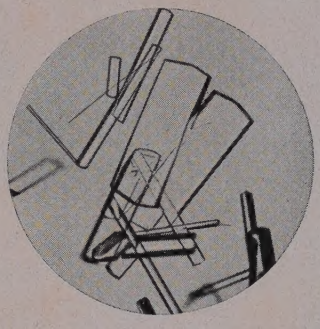
Den Chemikern der Sandoz AG. ist es gelungen, die herzwirksamen Stoffe aus verschiedenen Drogen als genuine, chemisch reine, kristallisierte Glykoside zu gewinnen:



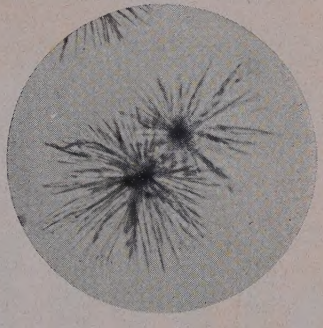
Lanatosid A



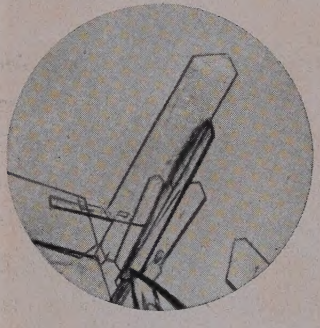
Lanatosid B, aus Digitalis lanata



Lanatosid C



k-Strophanthosid
aus Strophanthus kombé



Scillaren A
aus Scilla maritima

Durch Zusammenarbeit der Pharmakologen der Sandoz AG. mit Kliniken von Weltruf wurden sie der Therapie zugänglich gemacht:

DIGILANID
Lanatoside A, B und C in konstantem Mengenverhältnis

CEDILANID
Lanatosid C

STROPHOSID
k-Strophanthosid

SCILLAREN
Reinglykosid-Komplex der Scilla maritima (Meerzwiebel)

Maladie de Parkinson

DIPARCOL

(2987 R.P.)

Dragées dosées à 0g05 et 0g25
Ampoules de 5 cm³ dosées à 0g25

Le premier antiparkinsonien de synthèse découvert par
SPECIA-RHÔNE-POULENC

PARSIDOL

(3356 R.P.)

Comprimés dosés à 0g05

Améliore le pourcentage de résultats favorables

DIPARCOL-PARSIDOL peuvent être associés ou alternés suivant l'opportunité clinique

SOCIÉTÉ PARISIENNE D'EXPANSION CHIMIQUE
MARQUES
RHÔNE Specia POULENC
PARIS
INFORMATION MÉDICALE
28, COURS ALBERT 1er - TÉL. BAL. 10-70
Boite postale 53-08 - Paris 8e

ODETTE ZÉAU

ANNONCES DE PUBLICITÉ

EXPERIENTIA

Vol. VI - Fasc. 6 Pag. 201–240 15. VI. 1950

Chemical Specificity of Nucleic Acids and Mechanism of their Enzymatic Degradation[1]

By ERWIN CHARGAFF[2], New York, N.Y.

I. *Introduction*

The last few years have witnessed an enormous revival in interest for the chemical and biological properties of nucleic acids, which are components essential for the life of all cells. This is not particularly surprising, as the chemistry of nucleic acids represents one of the remaining major unsolved problems in biochemistry. It is not easy to say what provided the impulse for this rather sudden rebirth. Was it the fundamental work of E. HAMMARSTEN[3] on the highly polymerized desoxyribonucleic acid of calf thymus? Or did it come from the biological side, for instance the experiments of BRACHET[4] and CASPERSSON[5]? Or was it the very important research of AVERY[6] and his collaborators on the transformation of pneumococcal types that started the avalanche?

It is, of course, completely senseless to formulate a hierarchy of cellular constituents and to single out certain compounds as more important than others. The economy of the living cell probably knows no conspicuous waste; proteins and nucleic acids, lipids and polysaccharides, all have the same importance. But one observation may be offered. It is impossible to write the history of the cell without considering its geography; and we cannot do this without attention to what may be called the chronology of the cell, i. e. the sequence in which the cellular constituents are laid down and in which they develop from each other. If this is done, nucleic acids will be found pretty much at the beginning. An attempt to say more leads directly into empty speculations in which almost no field abounds more than the chemistry of the cell. Since an ounze of proof still weighs more than a pound of prediction, the important genetical functions, ascribed —probably quite rightly—to the nucleic acids by many workers, will not be discussed here. Terms such as "template" or "matrix" or "reduplication" will not be found in this lecture.

II. *Identity and Diversity in High Molecular Cell Constituents*

The determination of the constitution of a complicated compound, composed of many molecules of a number of organic substances, evidently requires the exact knowledge of the nature and proportion of all constituents. This is true for nucleic acids as much as for proteins or polysaccharides. It is, furthermore, clear that the value of such constitutional determinations will depend upon the development of suitable methods of hydrolysis. Otherwise, substances representing an association of many chemical individuals can be described in a qualitative fashion only; precise decisions as to structure remain impossible. When our laboratory, more than four years ago, embarked upon the study of nucleic acids, we became aware of this difficulty immediately.

The state of the nucleic acid problem at that time found its classical expression in LEVENE's monograph[1]. (A number of shorter reviews, indicative of the development of our conceptions concerning the chemistry of nucleic acids, should also be mentioned[2].) The old tetranucleotide hypothesis—it should never have been called a theory—was still dominant; and this was characteristic of the enormous sway that the organic chemistry of small molecules held over biochemistry. I should like to illustrate what I mean by one example. If in the investigation of a disaccharide consisting of two different hexoses we isolate 0·8 mole of one sugar and 0·7 mole of the other, this will be sufficient for the

[1] This article is based on a series of lectures given before the Chemical Societies of Zürich and Basle (June 29th and 30th, 1949), the Société de chimie biologique at Paris, and the Universities of Uppsala, Stockholm, and Milan.

[2] Department of Biochemistry, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York. The author wishes to thank the *John Simon Guggenheim Memorial Foundation* for making possible his stay in Europe. The experimental work has been supported by a research grant from the *United States Public Health Service*.

[3] E. HAMMARSTEN, Biochem. Z. *144*, 383 (1924).

[4] J. BRACHET in *Nucleic Acid*, Symposia Soc. Exp. Biol. No. 1 (Cambridge University Press, 1947), p. 207. Cp. J. BRACHET, in *Nucleic Acids and Nucleoproteins*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. *12*, 18. (Cold Spring Harbor, N.Y., 1947).

[5] T. CASPERSSON, in *Nucleic Acid*, Symp. Soc. Exp. Biol., No. 1 (Cambridge University Press, 1947), p. 127.

[6] O. T. AVERY, C. M. MACLEOD, and M. MCCARTY, J. Exp. Med. *79*, 137 (1944).

[1] P. A. LEVENE and L. W. BASS, Nucleic Acids (Chemical Catalog Co., New York, 1931).

[2] H. BREDERECK, Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe *1*, 121 (1938). – F. G. FISCHER, Naturwissensch. *30*, 377 (1942). – R. S. TIPSON, Adv. Carbohydrate Chem. *1*, 193 (1945). – J. M. GULLAND, G. R. BARKER, and D. O. JORDAN, Ann. Rev. Biochem. *14*, 175 (1945). – E. CHARGAFF and E. VISCHER, Ann. Rev. Biochem. *17*, 201 (1948). – F. SCHLENK, Adv. Enzymol. *9*, 455 (1949).

recognition of the composition of the substance, provided its molecular weight is known. The deviation of the analytical results from simple, integral proportions is without importance in that case. But this will not hold for high-molecular compounds in which variations in the proportions of their several components often will provide the sole indication of the occurrence of different compounds.

In attempting to formulate the problem with some exaggeration one could say: The validity of the identification of a substance by the methods of classical organic chemistry ends with the mixed melting point. When we deal with the extremely complex compounds of cellular origin, such as nucleic acids, proteins, or polysaccharides, a chemical comparison aiming at the determination of identity or difference must be based on the nature and the proportions of their constituents, on the sequence in which these constituents are arranged in the molecule, and on the type and the position of the linkages that hold them together. The smaller the number of components of such a high-molecular compound is, the greater is the difficulty of a decision. The occurrence of a very large number of different proteins was recognized early; no one to my knowledge ever attempted to postulate a protein as a compound composed of equimolar proportions of 18 or 20 different amino acids. In addition, immunological investigations contributed very much to the recognition of the multiplicity of proteins. A decision between identity and difference becomes much more difficult when, as is the case with the nucleic acids, only few primary components are encountered. And when we finally come to high polymers, consisting of one component only, e. g. glycogen or starch, the characterization of the chemical specificity of such a compound becomes a very complicated and laborious task.

While, therefore, the formulation of the tetranucleotide conception appeared explainable on historical grounds, it lacked an adequate experimental basis, especially as regards "thymonucleic acid". Although only two nucleic acids, the desoxyribose nucleic acid of calf thymus and the ribose nucleic acid of yeast, had been examined analytically in some detail, all conclusions derived from the study of these substances were immediately extended to the entire realm of nature; a jump of a boldness that should astound a circus acrobat. This went so far that in some publications the starting material for the so-called "thymonucleic acid" was not even mentioned or that it was not thymus at all, as may sometimes be gathered from the context, but, for instance, fish sperm or spleen. The animal species that had furnished the starting material often remained unspecified.

Now the question arises: How different must complicated substances be, before we can recognize their difference? In the multiformity of its appearances nature can be primitive and it can be subtle. It is primitive in creating in a cell, such as the tubercle bacillus, a host of novel compounds, new fatty acids, alcohols, etc., that are nowhere else encountered. There, the recognition of chemical peculiarities is relatively easy. But in the case of the proteins and nucleic acids, I believe, nature has acted most subtly; and the task facing us is much more difficult. There is nothing more dangerous in the natural sciences than to look for harmony, order, regularity, before the proper level is reached. The harmony of cellular life may well appear chaotic to us. The disgust for the amorphous, the ostensibly anomalous—an interesting problem in the psychology of science—has produced many theories that shrank gradually to hypotheses and then vanished.

We must realize that minute changes in the nucleic acid, e. g. the disappearance of one guanine molecule out of a hundred, could produce far-reaching changes in the geometry of the conjugated nucleoprotein; and it is not impossible that rearrangements of this type are among the causes of the occurrence of mutations[1].

The molecular weight of the pentose nucleic acids, especially of those from animal tissue cells, is not yet known; and the problem of their preparation and homogeneity still is in a very sad state. But that the desoxypentose nucleic acids, prepared under as mild conditions as possible and with the avoidance of enzymatic degradation, represent fibrous structures of high molecular weight, has often been demonstrated. No agreement has as yet been achieved on the order of magnitude of the molecular weight, since the interpretation of physical measurements of largely asymmetric molecules still presents very great difficulties. But regardless of whether the desoxyribonucleic acid of calf thymus is considered as consisting of elementary units of about 35,000 which tend to associate to larger structures[2] or whether it is regarded as a true macromolecule of a molecular weight around 820,000[3], the fact remains that the desoxypentose nucleic acids are high-molecular substances which in size resemble, or even surpass, the proteins. It is quite possible that there exists a critical range of molecular weights above which two different cells will prove unable to synthesize completely identical substances. The enormous number of diverse proteins may be cited as an example. *Duo non faciunt idem* is, with respect to cellular chemistry, perhaps an improved version of the old proverb.

III. *Purpose*

We started in our work from the assumption that the nucleic acids were complicated and intricate high-

[1] For additional remarks on this problem, compare E. CHARGAFF, in *Nucleic Acids and Nucleoproteins*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., *12*, 28 (Cold Spring Harbor, N.Y., 1947).

[2] E. HAMMARSTEN, Acta med. Scand., Suppl. *196*, 634 (1947). – G. JUNGNER, I. JUNGNER, and L.-G. ALLGÉN, Nature *163*, 849 (1949).

[3] R. CECIL and A. G. OGSTON, J. Chem. Soc. 1382 (1948).

polymers, comparable in this respect to the proteins, and that the determination of their structures and their structural differences would require the development of methods suitable for the precise analysis of all constituents of nucleic acids prepared from a large number of different cell types. These methods had to permit the study of minute amounts, since it was clear that much of the material would not be readily available. The procedures developed in our laboratory make it indeed possible to perform a complete constituent analysis on 2 to 3 mg of nucleic acid, and this in six parallel determinations.

The basis of the procedure is the partition chromatography on filter paper. When we started our experiments, only the qualitative application to amino acids was known[1]. But it was obvious that the high and specific absorption in the ultraviolet of the purines and pyrimidines could form the basis of a quantitative ultra-micro method, if proper procedures for the hydrolysis of the nucleic acids and for the sharp separation of the hydrolysis products could be found.

IV. *Preparation of the Analytical Material*

If preparations of desoxypentose nucleic acids are to be subjected to a structural analysis, the extent of their contamination with pentose nucleic acid must not exceed 2 to 3%. The reason will later be made clearer; but I should like to mention here that all desoxypentose nucleic acids of animal origin studied by us so far were invariably found to contain much more adenine than guanine. The reverse appears to be true for the animal pentose nucleic acids: in them guanine preponderates. A mixture of approximately equal parts of both nucleic acids from the same tissue, therefore, would yield analytical figures that would correspond, at least as regards the purines, to roughly equimolar proportions. Should the complete purification—sometimes an extremely difficult task—prove impossible in certain cases, one could think of subjecting preparations of both types of nucleic acid from the same tissue specimen to analysis and of correcting the respective results in this manner. This, however, is an undesirable device and was employed only in some of the preparations from liver which will be mentioned later.

It is, furthermore, essential that the isolation of the nucleic acids be conducted in such a manner as to exclude their degradation by enzymes, acid or alkali. In order to inhibit the desoxyribonucleases which require magnesium[2], the preparation of the desoxypentose nucleic acids was carried out in the presence of citrate ions[3]. It would take us here too far to describe in detail the methods employed in our laboratory for the preparation of the desoxypentose nucleic acids from animal tissues. They represent in general a combination of many procedures, as described recently for the isolation of yeast desoxyribonucleic acid[1]. In this manner, the desoxypentose nucleic acids of thymus, spleen, liver, and also yeast were prepared. The corresponding compound from tubercle bacilli was isolated *via* the nucleoprotein[2]. The procedures leading to the preparation of desoxypentose nucleic acid from human sperm will soon be published[3]. All desoxypentose nucleic acids used in the analytical studies were prepared as the sodium salts (in one case the potassium salt was used); they were free of protein, highly polymerized, and formed extremely viscous solutions in water. They were homogeneous electrophoretically and showed a high degree of monodispersity in the ultracentrifuge.

The procedure for the preparation of pentose nucleic acids from animal tissues resembled, in its first stages, the method of CLARKE and SCHRYVER[4]. The details of the isolation procedures and related experiments on yeast ribonucleic acid are as yet unpublished. Commercial preparations of yeast ribonucleic acid also were examined following purification. As has been mentioned before, the entire problem of the preparation and homogeneity of the pentose nucleic acids, and even of the occurrence of only one type of pentose nucleic acid in the cell, urgently requires re-examination.

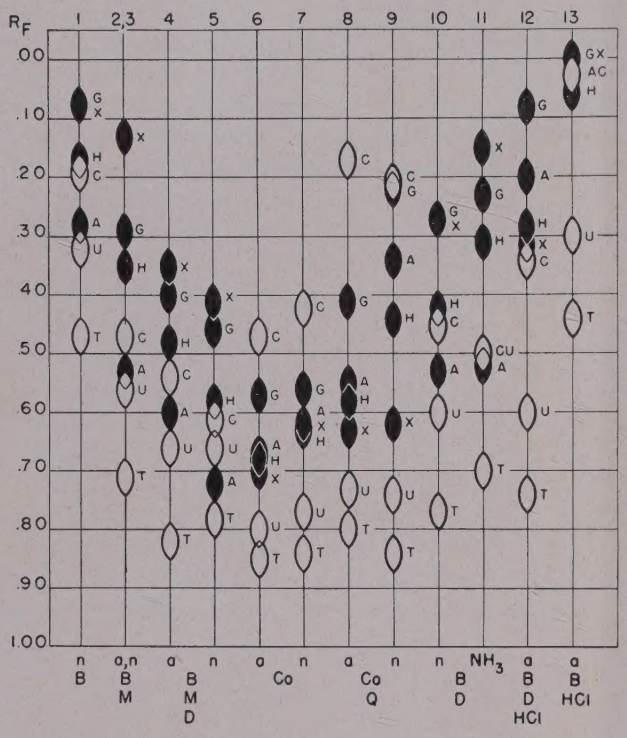
V. *Separation and Estimation of Purines and Pyrimidines*

Owing to the very unpleasant solubility and polar characteristics of the purines, the discovery of suitable solvent systems and the development of methods for their quantitative separation and estimation[5] presented a rather difficult problem in the solution of which Dr. ERNST VISCHER had an outstanding part. The pyrimidines proved somewhat easier to handle. The choice of the solvent system for the chromatographic separation of purines and pyrimidines will, of course, vary with the particular problem. The efficiency of different solvent systems in effecting separation is illustrated schematically in Fig. 1. Two of the solvent systems listed there are suitable for the separation of the purines found in nucleic acids, i. e. adenine and guanine, namely (1) n-butanol, morpholine, diethylene glycol, water (column 5 in Fig. 1); and (2) n-butanol, diethylene glycol, water in a NH_3 atmosphere (column 11). The second system listed proved particularly

[1] R. CONSDEN, A. H. GORDON, and A. J. P. MARTIN, Biochem. J. *38*, 224 (1944).
[2] F. G. FISCHER, I. BÖTTGER, and H. LEHMANN-ECHTERNACHT, Z. physiol. Chem. *271*, 246 (1941).
[3] M. MCCARTY, J. Gen. Physiol. *29*, 123 (1946).
[1] E. CHARGAFF and S. ZAMENHOF, J. Biol. Chem. *173*, 327 (1948).
[2] E. CHARGAFF and H. F. SAIDEL, J. Biol. Chem. *177*, 417 (1949).
[3] S. ZAMENHOF, L. B. SHETTLES, and E. CHARGAFF, Nature (in press).
[4] G. CLARKE and S. B. SCHRYVER, Biochem. J. *11*, 319 (1917).
[5] E. VISCHER and E. CHARGAFF, J. Biol. Chem. *168*, 781 (1947); *176*, 703 (1948).

convenient. The separation of the pyrimidines is carried out in aqueous butanol (column 1).

Following the separation, the location of the various adsorption zones on the paper must be demonstrated. Our first attempts to bring this about in ultraviolet light were unsuccessful, probably because of inadequate filtration of the light emitted by the lamp then at our disposal. For this reason, the expedient was



Schematic representation of the position on the paper chromatogram of the purines and pyrimidines following the separation of a mixture. *A* adenine, *G* guanine, *H* hypoxanthine, *X* xanthine, *U* uracil, *C* cytosine, *T* thymine. The conditions under which the separations were performed are indicated at the bottom, *a* acidic, *n* neutral, *B* n-butanol, *M* morpholine, *D* diethylene glycol, *Co* collidine, *Q* quinoline.

(Taken from E. VISCHER and E. CHARGAFF, J. Biol. Chem. *176*, 704 [1948].)

used of fixing the separated purines or pyrimidines on the paper as mercury complexes which then were made visible by their conversion to mercuric sulfide. The papers thus developed served as guide strips for the removal of the corresponding zones from untreated chromatograms that were then extracted and analyzed in the ultraviolet spectrophotometer. The development of the separated bases as mercury derivatives has, however, now become unnecessary, except for the preservation of permanent records, since there has for some time been available commercially an ultraviolet lamp emitting short wave ultraviolet ("Mineralight", Ultraviolet Products Corp., Los Angeles, California). With the help of this lamp it is now easy to demonstrate directly the position of the separated purines and pyrimidines (and also of nucleosides and nucleotides[1]) which appear as dark absorption shadows on the background of the fluorescing filter paper and can be cut apart accordingly. (We are greatly indebted to Dr. C. E. CARTER, Oak Ridge National Laboratory, who drew our attention to this instrument[2].)

The extracts of the separated compounds are then studied in the ultraviolet spectrophotometer. The measurement of complete absorption spectra permits the determination of the purity of the solutions and at the same time the quantitative estimation of their contents. The details of the procedures employed have been published[3]. In this manner, adenine, guanine, uracil, cytosine, and thymine (and also hypoxanthine, xanthine, and 5-methylcytosine[4]) can be determined quantitatively in amounts of 2–40 γ. The precision of the method is $\pm 4\%$ for the purines and even better for the pyrimidines, if the averages of a large series of determinations are considered. In individual estimations the accuracy is about $\pm 6\%$.

Procedures very similar in principle served in our laboratory for the separation and estimation of the ribonucleosides uridine and cytidine and for the separation of desoxyribothymidine from thymine. Methods for the separation and quantitative determination of the ribonucleotides in an aqueous ammonium isobutyrate-isobutyric acid system have likewise been developed[5].

VI. *Methods of Hydrolysis*

It has long been known that the purines can be split off completely by a relatively mild acid hydrolysis of the nucleic acids. This could be confirmed in our laboratory in a more rigorous manner by the demonstration that heating at 100° for 1 hour in N sulfuric acid effects the quantitative liberation of adenine and guanine from adenylic and guanylic acids respectively[6]. The liberation of the pyrimidines, however, requires much more energetic methods of cleavage. Heating at high temperatures with strong mineral acid under pressure is usually resorted to. To what extent these procedures brought about the destruction of the pyrimidines, could not be ascertained previously owing to the lack of suitable analytical procedures. The experiments summarized in Table I, which are quoted from a recent paper[6], show that the extremely robust cleavage methods with mineral acids usually employed must have led to a very considerable degradation of cytosine to uracil. Uracil and also thymine are much more resistant. For this reason, we turned to

[1] E. CHARGAFF, B. MAGASANIK, R. DONIGER, and E. VISCHER, J. Amer. Chem. Soc. *71*, 1513 (1949).

[2] A similar arrangement was recently described by E. R. HOLIDAY and E. A. JOHNSON, Nature *163*, 216 (1949).

[3] E. VISCHER and E. CHARGAFF, J. Biol. Chem. *176*, 703 (1948).

[4] J. KREAM and E. CHARGAFF, unpublished experiments.

[5] E. VISCHER, B. MAGASANIK, and E. CHARGAFF, Federation Proc. *8*, 263 (1949). – E. CHARGAFF, B. MAGASANIK, R. DONIGER, and E. VISCHER, J. Amer. Chem. Soc. *71*, 1513 (1949).

[6] E. VISCHER and E. CHARGAFF, J. Biol. Chem. *176*, 715 (1948).

Table I

Resistance of pyrimidines to treatment with strong acid. A mixture of pyrimidines of known concentration was dissolved in the acids indicated below and heated at 175° in a bomb tube. The concentration shifts of the individual pyrimidines were determined through a comparison of the recoveries of separated pyrimidines before and after the heating of the mixture.

Experiment No.	Acid	Heating time min.	Concentration shift, per cent of starting concentration		
			Uracil	Cytosine	Thymine
1	HCl (10%)	90	+62	−63	+3
2	10 N HCOOH + N HCl (1:1)	60	+ 3	− 5	0
3		120	+24	−19	0
4	HCOOH (98 to 100%)	60	0	− 1	−2
5		120	0	+ 2	+1

the hydrolysis of the pyrimidine nucleotides by means of concentrated formic acid. For the liberation of the purines N sulfuric acid (100°, 1 hour) is employed; for the liberation of the pyrimidines, the purines are first precipitated as the hydrochlorides by treatment with dry HCl gas in methanol and the remaining pyrimidine nucleotides cleaved under pressure with concentrated formic acid (175°, 2 hours). This procedure proved particularly suitable for the investigation of the desoxypentose nucleic acids. For the study of the composition of pentose nucleic acids a different procedure, making use of the separation of the ribonucleotides, was developed more recently, which will be mentioned later.

VII. *Composition of Desoxypentose Nucleic Acids*

It should be stated at the beginning of this discussion that the studies conducted thus far have yielded no indication of the occurrence in the nucleic acids examined in our laboratory of unusual nitrogenous constituents. In all desoxypentose nucleic acids investigated by us the purines were adenine and guanine, the pyrimidines cytosine and thymine. The occurrence in minute amounts of other bases, e.g. 5-methylcytosine, can, however, not yet be excluded. In the pentose nucleic acids uracil occurred instead of thymine.

A survey of the composition of desoxyribose nucleic acid extracted from several organs of the ox is provided in Table II. The molar proportions reported in each case represent averages of several hydrolysis experiments. The composition of desoxypentose nucleic acids from human tissues is similarly illustrated in Table III. The preparations from human liver were obtained from a pathological specimen in which it was possible, thanks to the kind cooperation of M. FABER, to separate portions of unaffected hepatic tissue from carcinomatous tissue consisting of metastases from the sigmoid colon, previous to the isolation of the nucleic acids[1].

Table II [1]

Composition of desoxyribonucleic acid of ox (in moles of nitrogenous constituent per mole of P).

Constituent	Thymus			Spleen		Liver
	Prep. 1	Prep. 2	Prep. 3	Prep. 1	Prep. 2	
Adenine	0·26	0·28	0·30	0·25	0·26	0·26
Guanine	0·21	0·24	0·22	0·20	0·21	0·20
Cytosine	0·16	0·18	0·17	0·15	0·17	
Thymine	0·25	0·24	0·25	0·24	0·24	
Recovery	0·88	0·94	0·94	0·84	0·88	

[1] From E. CHARGAFF, E. VISCHER, R. DONIGER, C. GREEN, and F. MISANI, J. Biol. Chem. *177*, 405 (1949); and unpublished results.

Table III [2]

Composition of desoxypentose nucleic acid of man (in moles of nitrogenous constituent per mole of P).

Constituent	Sperm		Thymus	Liver	
	Prep. 1	Prep. 2		Normal	Carcinoma
Adenine	0·29	0·27	0·28	0·27	0·27
Guanine	0·18	0·17	0·19	0·19	0·18
Cytosine	0·18	0·18	0·16		0·15
Thymine	0·31	0·30	0·28		0·27
Recovery	0·96	0·92	0·91		0·87

In order to show examples far removed from mammalian organs, the composition of two desoxyribonucleic acids of microbial origin, namely from yeast[3] and from avian tubercle bacilli[4], is summarized in Table IV.

Table IV [5]

Composition of two microbial desoxyribonucleic acids.

Constituent	Yeast		Avian tubercle bacilli
	Prep. 1	Prep. 2	
Adenine	0·24	0·30	0·12
Guanine	0·14	0·18	0·28
Cytosine	0·13	0·15	0·26
Thymine	0·25	0·29	0·11
Recovery	0·76	0·92	0·77

The very far-reaching differences in the composition of desoxypentose nucleic acids of different species are best illustrated by a comparison of the ratios of adenine to guanine and of thymine to cytosine as given in Table V. It will be seen that in all cases where enough material for statistical analysis was available highly significant differences were found. The analytical figures on which Table V is based were derived by comparing the ratios found for individual nucleic acid hydrolysates of one species regardless of the organ from which the preparation was isolated. This procedure assumes that there is no organ specificity with

[1] Unpublished experiments.

[2] From E. CHARGAFF, S. ZAMENHOF, and C. GREEN, Nature (in press); and unpublished results.

[3] E. CHARGAFF and S. ZAMENHOF, J. Biol. Chem. *173*, 327 (1948).

[4] E. CHARGAFF and H. F. SAIDEL, J. Biol. Chem. *177*, 417 (1949).

[5] From E. VISCHER, S. ZAMENHOF, and E. CHARGAFF, J. Biol. Chem. *177*, 429 (1949); and unpublished results.

Table V

Molar proportions of purines and pyrimidines in desoxypentose nucleic acids from different species.

Species	Number of different organs	Number of different preparations	Adenine/Guanine			Thymine/Cytosine		
			Number of hydrolyses[3]	Mean ratio	Standard error	Number of hydrolyses[3]	Mean ratio	Standard error
Ox[1]	3	7	20	1·29	0·013	6	1·43	0·03
Man[2]	2	3	6	1·56	0·008	5	1·75	0·03
Yeast	1	2	3	1·72	0·02	2	1·9	
Avian tubercles bacillus	1	1	2	0·4		1	0·4	

[1] Preparations from thymus, spleen, and liver served for the purine determinations, the first two organs for the estimation of pyrimidines.

[2] Preparations from spermatozoa and thymus were analysed.

[3] In each hydrolysis between 12 and 24 determinations of individual purines and pyrimidines were performed.

respect to the composition of desoxypentose nucleic acids of the same species. That this appears indeed to be the case may be gathered from Tables II and III and even better from Table VI where the average purine and pyrimidine ratios in individual tissues of the same species are compared. That the isolation of nucleic acids did not entail an appreciable fractionation is shown by the finding that when whole defatted human spermatozoa, after being washed with cold 10% trichloroacetic acid, were analyzed, the same ratios of adenine to guanine and of thymine to cytosine were found as are reported in Tables V and VI. It should also be mentioned that all preparations, with the exception of those from human liver, were derived from pooled starting material representing a number, and in the case of human spermatozoa a very large number, of individuals.

Table VI

Molar proportions of purines and pyrimidines in desoxypentose nucleic acids from different organs of one species.

Species	Organ	Adenine/ Guanine	Thymine/ Cytosine
Ox	Thymus	1·3	1·4
	Spleen	1·2	1·5
	Liver	1·3	
Man	Thymus	1·5	1·8
	Sperm	1·6	1·7
	Liver (normal)	1·5	1·8
	Liver (carcinoma)	1·5	1·8

The desoxypentose nucleic acids extracted from different species thus appear to be different substances or mixtures of closely related substances of a composition constant for different organs of the same species and characteristic of the species.

The results serve to disprove the tetranucleotide hypothesis. It is, however, noteworthy—whether this is more than accidental, cannot yet be said—that in all desoxypentose nucleic acids examined thus far the molar ratios of total purines to total pyrimidines, and also of adenine to thymine and of guanine to cytosine, were not far from 1.

VIII. *Composition of Pentose Nucleic Acids*

Here a sharp distinction must be drawn between the prototype of all pentose nucleic acid investigations—the ribonucleic acid of yeast—and the pentose nucleic acids of animal cells. Nothing is known as yet about bacterial pentose nucleic acids. In view of the incompleteness of our information on the homogeneity of pentose nucleic acids, which I have stressed before, I feel that the analytical results on these preparations do not command the same degree of confidence as do those obtained for the desoxypentose nucleic acids.

Table VIII[1]

Composition of pentose nucleic acids from animal tissues.

Constituent	Calf liver	Ox liver	Sheep liver	Pig liver	Pig pancreas
Guanylic acid . . .	16·3	14·7	16·7	16·2	22·5
Adenylic acid . . .	10	10	10	10	10
Cytidylic acid . . .	11·1	10·9	13·4	16·1	9·8
Uridylic acid . . .	5·3	6·6	5·6	7·7	4·6
Purines: pyrimidines	1·6	1·4	1·4	1·1	2·5

Three procedures, to which reference is made in Tables VII and VIII, were employed in our laboratory for the analysis of pentose nucleic acids. In *Procedure 1*, the pentose nucleic acid was hydrolysed to the nucleotide stage with alkali, at p_H 13·5 and 30°, and the nucleotides, following adjustment to about p_H 5, separated by chromatography with aqueous ammonium isobutyrate-isobutyric acid as the solvent. Under these conditions, guanylic acid shares its position on the chromatogram with uridylic acid; but it is possible to determine the concentrations of the two components in the eluates by simultaneous equations based on the ultraviolet absorption of the pure nucleotides[2]. The very good recoveries of nucleotides obtained in terms of both nucleic acid phosphorus and nitrogen show the cleavage by mild alkali treatment of pentose nucleic acids to be practically quantitative.—In

[1] Unpublished results.

[2] E. VISCHER, B. MAGASANIK, and E. CHARGAFF, Federation Proc. *8*, 263 (1949). – E. CHARGAFF, B. MAGASANIK, R. DONIGER, and E. VISCHER, J. Amer. Chem. Soc. *71*, 1513 (1949).

Table VII[1]

Composition of yeast ribonucleic acid (in moles of nitrogenous constituent per mole of P).

Constituent	Preparation 1			Preparation 2			Preparation 3		
	Procedure 1	Procedure 2	Procedure 3	Procedure 1	Procedure 2	Procedure 3	Procedure 1	Procedure 2	Procedure 3
Adenylic acid	0·29	0·26	0·26	0·27		0·24	0·25	0·23	0·24
Guanylic acid	0·28	0·29	0·26	0·25		0·25	0·26	0·28	0·26
Cytidylic acid	0·18	0·17	0·24	0·20			0·21	0·21	
Uridylic acid	0·20	0·20	0·08	0·18	0·19		0·20	0·25	
Recovery	0·95	0·92	0·84	0·90			0·92	0·97	

[1] From E. VISCHER and E. CHARGAFF, J. Biol. Chem. *176*, 715 (1948). – E. CHARGAFF, B. MAGASANIK, R. DONIGER, and E. VISCHER, J. Amer. Chem. Soc. *71*, 1513 (1949); and unpublished results.

Procedure 2, the purines are first liberated by gaseous HCl in dry methanol and the evaporation residue of the reaction mixture is adjusted to p_H 13·5 and then treated as in Procedure 1. In this manner, uridylic and cytidylic acids, adenine and guanine are separated and determined on one chromatogram.—The determinations of free purines and pyrimidines in acid hydrolysates of pentose nucleic acids, following the methods outlined before for the desoxypentose nucleic acids, are listed as *Procedure 3*. It will be seen that it is mainly uracil which in this procedure escapes quantitative determination. This is due to the extreme refractoriness of uridylic acid to complete hydrolysis by acids, a large portion remaining partially unsplit as the nucleoside uridine. As matters stand now, I consider the values for purines yielded by Procedures 1 and 3 and those for pyrimidines found by Procedures 1 and 2 as quite reliable.

A survey of the composition of yeast ribonucleic acid is provided in Table VII. Preparations 1 and 2, listed in this table, were commercial preparations that had been purified in our laboratory and had been subjected to dialysis; Preparation 3 was isolated from baker's yeast by B. MAGASANIK in this laboratory by procedures similar to those used for the preparation of pentose nucleic acids from animal tissues and had not been dialyzed. It will be seen that the results are quite constant and not very far from the proportions required by the presence of equimolar quantities of all four nitrogenous constituents.

An entirely different picture, however, was encountered when the composition of pentose nucleic acids from animal cells was investigated. A preliminary summary of the results, in all cases obtained by *Procedure 1*, is given in Table VIII. Here guanylic acid was the preponderating nucleotide followed, in this order, by cytidylic and adenylic acids; uridylic acid definitely was a minor constituent. This was true not only of the ribonucleic acid of pancreas which has been known to be rich in guanine[1], but also of all pentose nucleic acids isolated by us from the livers of three different species (Table VIII).

In the absence of a truly reliable standard method for the isolation of pentose nucleic acid from animal tissue, generalizations are not yet permitted; but it would appear that pentose nucleic acids from the same organ of different species are more similar to each other, at least in certain respects (e. g. the ratio of guanine to adenine), than are those from different organs of the same species. (Compare the pentose nucleic acids from the liver and the pancreas of pig in Table VIII.)

IX. *Sugar Components*

It is deplorable that such designations as desoxyribose and ribose nucleic acids continue to be used as if they were generic terms. Even the "thymus nucleic acid of fish sperm" is encountered in the literature. As a matter of fact, only in a few cases have the sugars been identified, namely, *d*-2-desoxyribose as a constituent of the guanine and thymine nucleosides of the desoxypentose nucleic acid from calf thymus, D-ribose as a constituent of the pentose nucleic acids from yeast, pancreas, and sheep liver.

Since the quantities of novel nucleic acids usually will be insufficient for the direct isolation of their sugar components, we attempted to employ the very sensitive procedure of the filter paper chromatography of sugars[1] for the study of the sugars isolated from minute quantities of nucleic acids. It goes without saying that identifications based on behavior in adsorption or partition are by no means as convincing as the actual isolation, but they will at least permit a tentative classification of new nucleic acids. Thus far the pentose nucleic acids of pig pancreas[2] and of the avian tubercle bacillus[3] have been shown to contain ribose, the desoxypentose nucleic acids of ox spleen[4],

[1] E. HAMMARSTEN, Z. physiol. Ch. *109*, 141 (1920). – P. A. LEVENE and E. JORPES, J. Biol. Chem. *86*, 389 (1930). – E. JORPES, Biochem. J. *28*, 2102 (1934).

[1] S. M. PARTRIDGE, Nature *158*, 270 (1946). – S. M. PARTRIDGE and R. G. WESTALL, Biochem. J. *42*, 238 (1948). – E. CHARGAFF, C. LEVINE, and C. GREEN, J. Biol. Chem. *175*, 67 (1948).

[2] E. VISCHER and E. CHARGAFF, J. Biol. Chem. *176*, 715 (1948).

[3] E. VISCHER, S. ZAMENHOF, and E. CHARGAFF, J. Biol. Chem. *177*, 429 (1949).

[4] E. CHARGAFF, E. VISCHER, R. DONIGER, C. GREEN, and F. MISANI, J. Biol. Chem. *177*, 405 (1949).

yeast and avian tubercle bacilli[1] desoxyribose. It would seem that the free play with respect to the variability of components that nature permits itself is extremely restricted, where nucleic acids are concerned.

X. *Depolymerizing Enzymes*

Enzymes capable of bringing about the depolymerization of both types of nucleic acids have long been known; but it is only during the last decade that crystalline ribonuclease[2] and desoxyribonuclease[3] from pancreas have become available thanks to the work of KUNITZ. Important work on the latter enzyme was also done by MCCARTY[4].

Table IX[5]

Enzymatic degradation of calf thymus desoxyribonucleic acid.

	Digestion *hours*	Dialysis *hours*	Distribution of fractions % of original	Composition of fractions (molar proportions)			
				Adenine / Guanine	Thymine / Cytosine	Adenine / Cytosine	Pyrimidines / Purines
Original . . .	0	0	100	1·2	1·3	1·6	1·2
Dialysate . . .	6	6	53	1·2	1·2	1·2	1·0
Dialysis residue	24	72	7	1·6	2·2	3·8	2·0

We were, of course, interested in applying the chromatographic micromethods for the determination of nucleic acid constituents to studies of enzymatic reaction mechanisms for which they are particularly suited. The action of crystalline desoxyribonuclease on calf thymus desoxyribonucleic acid resulted in the production of a large proportion of dialyzable fragments (53 per cent of the total after 6 hours digestion), without liberation of ammonia or inorganic phosphate. But even after extended digestion there remained a non-dialyzable core whose composition showed a significant divergence from both the original nucleic acid and the bulk of the dialyzate[6]. The preliminary findings summarized in Table IX indicate a considerable increase in the molar proportions of adenine to guanine and especially to cytosine, of thymine to cytosine, and of purines to pyrimidines. This shows that the dissymmetry in the distribution of constituents, found in the original nucleic acid (Table II), is intensified in the core. The most plausible explanations of this interesting phenomenon, the study of which is being continued, are that the preparations consisted of more than one desoxypentose nucleic acid or that the nucleic contained in its chain clusters of nucleotides (relatively richer in adenine and thymine) that were distinguished from the bulk of the molecule by greater resistance to enzymatic disintegration.

In this connection another study, carried out in collaboration with S. ZAMENHOF, should be mentioned briefly that dealt with the desoxypentose nuclease of yeast cells[1]. This investigation afforded a possibility of exploring the mechanisms by which an enzyme concerned with the disintegration of desoxypentose nucleic acid is controlled in the cell. Our starting point again was the question of the specificity of desoxypentose nucleic acids; but the results were entirely unexpected. Since we had available a number of nucleic acids from different sources, we wanted to study a pair of desoxypentose nucleic acids as distant from each other as possible, namely that of the ox and that of yeast, and to investigate the action on them of the two desoxypentose nucleases from the same cellular sources. The desoxyribonuclease of ox pancreas has been thoroughly investigated, as was mentioned before. Nothing was known, however, regarding the existence of a yeast desoxypentose nuclease.

It was found that fresh salt extracts of crushed cells contained such an enzyme in a largely inhibited state, due to the presence of a specific inhibitor protein. This inhibitor specifically inhibited the desoxypentose nuclease from yeast, but not that from other sources, such as pancreas. The yeast enzyme depolymerized the desoxyribose nucleic acids of yeast and of calf thymus, which differ chemically, as I have emphasized before, at about the same rate. In other words, the enzyme apparently exhibited inhibitor specificity, but not substrate specificity. It is very inviting to assume that such relations between specific inhibitor and enzyme, in some ways reminiscent of immunological reactions, are of more general biological significance. In any event, a better understanding of such systems will permit an insight into the delicate mechanisms through which the cell manages the economy of its life, through which it maintains its own continuity and protects itself against agents striving to transform it.

XI. *Concluding Remarks*

Generalizations in science are both necessary and hazardous; they carry a semblance of finality which conceals their essentially provisional character; they drive forward, as they retard; they add, but they also take away. Keeping in mind all these reservations, we arrive at the following conclusions. The desoxypentose nucleic acids from animal and microbial cells contain varying proportions of the same four nitrogenous constituents, namely, adenine, guanine, cytosine, thymine. Their composition appears to be characteristic of the species, but not of the tissue, from which

[1] E. VISCHER, S. ZAMENHOF, and E. CHARGAFF, J. Biol. Chem. *177*, 429 (1949).

[2] M. KUNITZ, J. Gen. Physiol. *24*, 15 (1940).

[3] M. KUNITZ, Science *108*, 19 (1948).

[4] M. MCCARTY, J. Gen. Physiol. *29*, 123 (1946).

[5] From S. ZAMENHOF and E. CHARGAFF, J. Biol. Chem. *178*, 531 (1949).

[6] S. ZAMENHOF and E. CHARGAFF, J. Biol. Chem. *178*, 531 (1949).

[1] S. ZAMENHOF and E. CHARGAFF, Science *108*, 628 (1948); J. Biol. Chem. *180*, 727 (1949).

they are derived. The presumption, therefore, is that there exists an enormous number of structurally different nucleic acids; a number, certainly much larger than the analytical methods available to us at present can reveal.

It cannot yet be decided, whether what we call the desoxypentose nucleic acid of a given species is one chemical individual, representative of the species as a whole, or whether it consists of a mixture of closely related substances, in which case the constancy of its composition merely is a statistical expression of the unchanged state of the cell. The latter may be the case if, as appears probable, the highly polymerized desoxypentose nucleic acids form an essential part of the hereditary processes; but it will be understood from what I said at the beginning that a decision as to the identity of natural high polymers often still is beyond the means at our disposal. This will be particularly true of substances that differ from each other only in the sequence, not in the proportion, of their constituents. The number of possible nucleic acids having the same analytical composition is truly enormous. For example, the number of combinations exhibiting the same molar proportions of individual purines and pyrimidines as the desoxyribonucleic acid of the ox is more than 10^{56}, if the nucleic acid is assumed to consist of only 100 nucleotides; if it consists of 2,500 nucleotides, which probably is much nearer the truth, then the number of possible "isomers" is not far from 10^{1500}.

Moreover, desoxypentose nucleic acids from different species differ in their chemical composition, as I have shown before; and I think there will be no objection to the statement that, as far as chemical possibilities go, they could very well serve as one of the agents, or possibly as the agent, concerned with the transmission of inherited properties. It would be gratifying if one could say—but this is for the moment no more than an unfounded speculation—that just as the desoxypentose nucleic acids of the nucleus are species–specific and concerned with the maintenance of the species, the pentose nucleic acids of the cytoplasm are organ-specific and involved in the important task of differentiation.

I should not want to close without thanking my colleagues who have taken part in the work discussed here; they are, in alphabetical order, Miss R. DONIGER, Mrs. C. GREEN, Dr. B. MAGASANIK, Dr. E. VISCHER, and Dr. S. ZAMENHOF.

Zusammenfassung

Die Betrachtung der Nukleinsäuren, sowohl der Desoxypentosen als der Pentosen enthaltenden Verbindungen, als organische Makromoleküle macht eine Auseinandersetzung mit den Problemen notwendig, welche sich auf die Bestimmung von Identität oder Verschiedenheit solcher aus verschiedenen Zellen isolierten hochpolymeren Substanzen beziehen. Dies führt zu einer kritischen Besprechung der sicherlich nicht haltbaren Tetranukleotidhypothese und zur Formulierung eines Arbeitsprogramms für die Aufklärung der Zusammensetzung individueller Nukleinsäuren.

Die mikrochromatographischen und spektrophotometrischen Methoden zur Trennung und quantitativen Bestimmung der stickstoffhaltigen Nukleinsäurebestandteile werden kurz geschildert. Sie ermöglichen die quantitative Analyse der Purine Adenin, Guanin, Hypoxanthin und Xanthin und der Pyrimidine Cytosin, Uracil und Thymin im Bereiche von 2 bis 40 γ. An die Beschreibung der Verfahren zur Isolierung der als Analysenmaterial dienenden hochpolymerisierten Nukleinsäurepräparate aus verschiedenen Zellen schließt sich eine Besprechung der Hydrolysen- und Analysenmethoden, die auf sehr geringe Nukleinsäuremengen (2 bis 3 mg) anwendbar sind.

Alle bis jetzt untersuchten Desoxypentosenukleinsäuren enthielten 2-Desoxyribose als Zucker und Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin als Stickstoffkomponenten in für die betreffende Zelle konstanten, von der Tetranukleotidhypothese weit abweichenden Proportionen. Ihre Zusammensetzung ist spezifisch für die Spezies, die als Ausgangsmaterial dient, jedoch nicht für das Ausgangsgewebe. Weit auseinanderliegende Arten, wie z. B. Säugetiere gegenüber Mikroorganismen, enthalten völlig verschieden zusammengesetzte Desoxypentosenukleinsäuren. In manchen Fällen lassen sich jedoch auch bei näherliegenden Nukleinsäuren, z. B. denen des Ochsen und des Menschen, ins Gewicht fallende Verschiedenheiten aufzeigen. Die Untersuchung der Pentosenukleinsäuren, die auf einer quantitativen Bestimmung der sie zusammensetzenden Mononukleotide beruht, ist noch nicht so weit gediehen. Sie hat vorläufig gezeigt, daß sich die Verbindungen aus Säugetiergewebe von denen aus Hefe durch einen relativ sehr hohen Gehalt an Guanylsäure unterscheiden, und hat Anhaltspunkte dafür gegeben, daß die Pentosenukleinsäuren eher organ- als spezies-spezifisch sind.

Als Beispiele für den Beitrag, den die Untersuchung enzymatischer Reaktionsmechanismen zum Problem der chemischen Spezifizität der Nukleinsäuren leisten kann, werden schließlich Versuche mit der kristallisierten Desoxyribonuklease aus Pankreas und mit einer durch interessante Hemmungsstoffspezifizität ausgezeichneten Desoxypentosenuklease aus Hefe geschildert. Zum Abschluß werden einige der Probleme gestreift, die sich aus der hier nachgewiesenen Existenz vieler verschiedener Nukleinsäuren ergeben.

Die Sonne als Kompaß im Leben der Bienen[1]

Von K. v. Frisch, Graz[2, 3]

1. *Zur Einführung: Die Tänze der Bienen bei vertikaler und horizontaler Wabenstellung*

Versuche der letzten Jahre haben gelehrt, daß Bienen nach der Heimkehr von einer guten Trachtquelle durch ihre Tänze auf der Wabe den Stockgenossen erstaunlich genaue Angaben über die Art und die Lage des Futterplatzes übermitteln. Der spezifische Duft des eingetragenen Nektars und der am Körper haftende Blütenduft verraten die beflogene *Blütensorte*. Rundtänze weisen auf nahe gelegene Futterquellen hin; Schwänzeltänze finden statt, wenn der Fundplatz der Nahrung 100 m vom Heimatstock oder weiter entfernt liegt. In diesem Falle wird durch das Tempo des Schwänzeltanzes die *Entfernung* der Trachtquelle und durch die Richtung des geradlinigen Schwänzellaufes die *Richtung* zu ihr angezeigt, wobei der Sonnenstand als Bezugspunkt dient. In der Regel wird im dunklen Inneren des Bienenstockes auf der vertikalen Wabenfläche getanzt. Die Sonne ist also nicht sichtbar. Die Tänzerin überträgt dann die Richtung zur Sonne auf die Richtung zur Schwerkraft und läuft den Schwänzellauf auf der Wabe nach oben, wenn der Weg zum Futterplatz in der Richtung zur Sonne liegt, oder 50° nach rechts von der Richtung nach oben, wenn die Linie vom Stock zum Futterplatz um 50° nach rechts von der Richtung zur Sonne führt usw. Hierüber wurde in früheren Jahrgängen dieser Zeitschrift berichtet[4] und es ist zum Verständnis des folgenden nicht notwendig, an die Einzelheiten zu erinnern.

Gelegentlich sind tanzende Bienen auf dem *horizontalen Anflugbrettchen* vor dem Flugloch zu sehen, also unter freiem Himmel. Man kann solche Tänze auf horizontaler Fläche auch unter den Glasfenstern eines Beobachtungsstockes auslösen, wenn man diesen so umkippt, daß die Wabenflächen horizontal liegen. Auf der waagrechten Fläche fällt die Schwerkraft als Orientierungsfaktor aus. Die Bienen weisen nun durch den geradlinigen Schwänzellauf unmittelbar die Richtung zum Ziel (Abb. 1 *a*).

Wie das möglich ist, kann man leicht verstehen, wenn die Sonne für die Tänzerin sichtbar ist. Sie braucht dann beim Schwänzellauf nur denselben Winkel zum Sonnenstand einzuhalten, wie zuvor beim Flug vom Stock zum Futterplatz, um die Richtung dorthin zu weisen (Abb. 1 *b*, *c*)[1]. Man kann sich auch vorstellen, wie die Stockgenossen von dieser Weisung Gebrauch machen. Sie verfolgen ja die Tänzerin bei allen Wendungen und trippeln beim Schwänzellauf hinter ihr her; wenn sie sich hierbei den Winkel zum Sonnenstand einprägen und hernach beim Ausflug denselben Winkel zur Sonne einhalten, haben sie die Richtung zum Futterplatz.

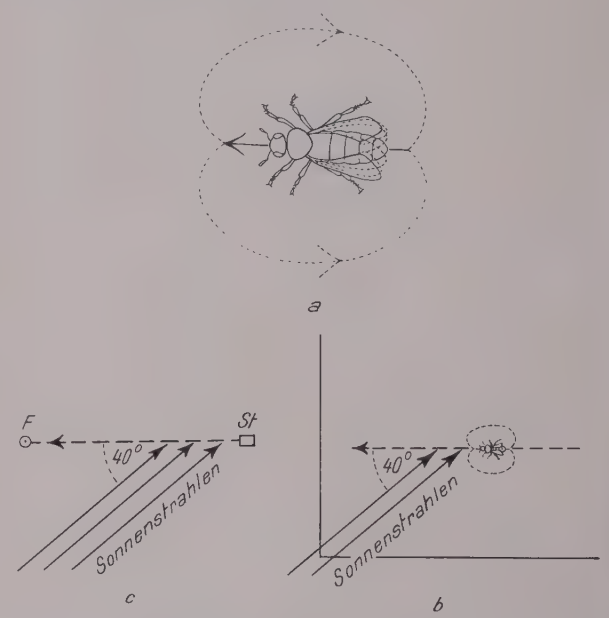


Abb. 1. *a* Schwänzeltanz auf horizontaler Wabe bei westlich gelegenem Futterplatz; der geradlinige Schwänzellauf weist nach Westen. *b* Die Biene hält beim Schwänzellauf auf der horizontalen Wabe denselbenWinkel zur Sonne ein wie (*c*) beim Flug vom Stock (*St*) zum Futterplatz (*F*).

Zu dieser Deutung stimmt die Tatsache, daß die Bienen unter einem lichtdichten Zelt bei roter, für sie nicht wahrnehmbarer Beleuchtung beim Tanz auf waagrechter Fläche die Richtung zum Futterplatz *nicht* angeben können. Auch bei diffusem Licht, z. B. unter einem Leinenzelt, sind ihre Tänze desorientiert. Sie weisen aber sofort die Richtung zum Futterplatz, sobald man ihnen ein Stück *blauen Himmels* sichtbar macht. Der Anblick der Sonne ist nicht nötig.

2. *Die Polarisation des Himmelslichtes als orientierender Faktor*

Es genügt schon ein kleines Stück klaren Himmels, um den Bienen die Orientierung nach dem Sonnen-

[1] Vorgetragen im Verein für Naturkunde, München, am 7. November 1949.

[2] Zoologisches Institut der Universität Graz; jetzt: Zoologisches Institut der Universität München.

[3] Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Rockefeller Foundation gemacht.

[4] K. v. Frisch, Exper. *2*, 397 (1946) und *5*, 142 (1949). Daselbst auch weitere Literatur.

[1] Daß Ameisen und Bienen, die sich in einförmigem Gelände ohne auffällige optische Orientierungsmarken bewegen, die Sonne als Kompaß benützen, ist durch die schönen Versuche von Santschi, Brun und Wolf schon lange bekannt.

stande zu ermöglichen. Sie tanzten richtig, wenn ich ihnen im allseits geschlossenen Zelt durch ein schräg eingesetztes Ofenrohr einen kreisrunden blauen Fleck im Ausmaße von etwa 10 Winkelgraden sichtbar machte. Wurde vor dem nach Norden gerichteten Rohr ein Spiegel angebracht, so daß die Bienen im Norden Himmelslicht aus Süden sahen, so wiesen sie die Richtung zum Futterplatz spiegelbildlich falsch. Daraus war zu schließen, daß sie am Himmel eine nach der Sonne ausgerichtete Erscheinung wahrnehmen, nach der sie sich orientieren können – vermutlich die lineare *Polarisation* des Himmelslichtes, deren Intensität und Schwingungsebene vom Sonnenstande abhängig ist (Abb. 2). Diese Annahme war auch dadurch begründet, daß Wolken vor dem blauen Himmel das Licht depolarisieren und gleichzeitig die Tänze der

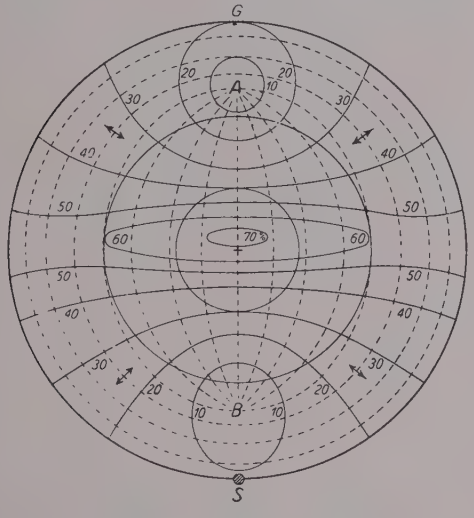


Abb. 2. Die Verteilung der Polarisation am Himmel für Horizontstand der Sonne (schematisch). Die über dem Horizont befindliche Himmelshalbkugel ist in der äußeren Zenitprojektion abgebildet. Außer dem Horizont sind noch die Höhenparallelen 30° und 60° gezeichnet. Die ausgezogenen Kurven sind Linien gleicher Polarisationsstärke (die Zahlen bedeuten den Prozentsatz polarisierten Lichtes). Die gestrichelten Kurven geben die Lage der «Polarisationsebene» an, die senkrecht zu den Schwingungen der Ätherwellen steht. Die Schwingungsrichtung ist an 4 Stellen mit kleinen Strichen und Pfeilen angezeichnet. Ohne auf die verwickelten Einzelheiten einzugehen, vermittelt die Skizze doch ein Bild der herrschenden Ordnung. *B* Babinetscher Punkt (neutraler Punkt, ohne Polarisation, über der Sonne *S*); *A* Aragoscher Punkt (neutraler Punkt über dem Gegenpunkt der Sonne *G*). – Mit aufsteigender Sonne verschiebt sich das Bild, indem Intensität und Schwingungsrichtung des polarisierten Himmelslichtes ihre Lagebeziehung zum Sonnenstand im wesentlichen beibehalten.
(Nach Müller-Pouillet, Lehrbuch der Physik, 1928, S. 234.)
11. Aufl. V/1.

Bienen desorientieren. Sie wurde zur Gewißheit, als es 1948 gelang, die Tänze der Bienen durch polarisiertes Licht abzulenken[1]. Zu diesem Zweck wurde eine Polarisationsfolie über die horizontale Wabenfläche mit den tanzenden Bienen gelegt. Es hat sich dabei herausgestellt, daß die Richtungsweisung auch unter der Folie zutreffend ist, wenn die Schwingungsebene des polarisierten Himmelslichtes beim Durchgang durch die Folie unverändert bleibt. Dreht man die Folie aus dieser Stellung heraus, so ändert sich die Tanzrichtung der Bienen im gleichen Sinne. Wurde die Folie um mehr als 55° aus jener Ausgangslage herausgedreht, so waren die Tänze desorientiert. Die Bedeutung des polarisierten Himmelslichtes als orientierender Faktor war hiermit erwiesen. Aber die quantitativen Beziehungen zwischen der Winkeldrehung der Folie und der Änderung der Tanzrichtung waren mir unverständlich und, besonders in sonnennaher Himmelsgegend, von verwirrender Verschiedenheit.

3. *Der Bau des Bienenauges und* Autrums *Hypothese*

Die beiden Facettenaugen sind seitlich am Kopf starr eingefügt und erfassen mit ihren je 4–5000 Einzelaugen (vgl. Abb. 3) ein allseits geschlossenes Ge-

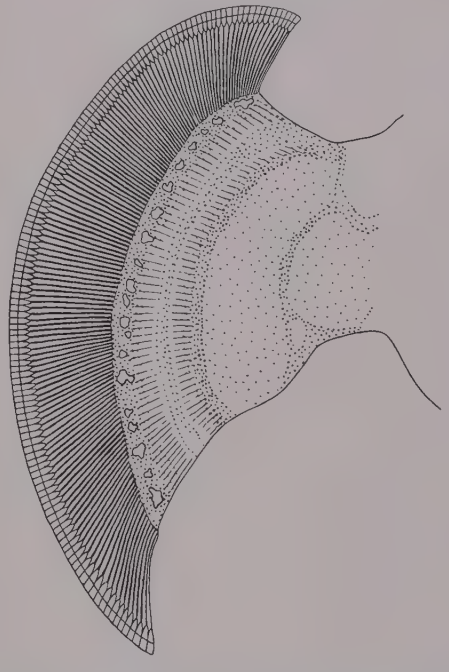


Abb. 3. Dorsoventraler Längsschnitt durch das zusammengesetzte *Auge der Biene* (Arbeiterin). Zeichnung nach einem von del Portillo hergestellten mikroskopischen Präparat.

sichtsfeld[1]. Es sei daran erinnert, daß in jedem Einzelauge die aus Chitin bestehende Hornhautfacette (Abb. 4*C*) und der Kristallkegel (*K*) den dioptrischen Teil bilden, an den sich der langgestreckte nervöse Teil (*R*) anschließt. Der Bau dieses letzteren wird am besten aus Querschnittsbildern verständlich. Jedem Kristallkegel sind im Bienenauge 8 Retinulazellen zugeordnet, die ein Sehstäbchen (Rhabdom) zentral umschließen. Dieses ist als kutikulare Abscheidung der Retinulazellen aufzufassen und daher aus 8 Teilstücken (Rhabdomeren) zusammengesetzt, die manchmal deutlich voneinander getrennt bleiben. Abb. 5 zeigt dies an einem Fliegenauge (mit nur 7 Retinula-

[1] K. v. Frisch, Exper. *5*, 142 (1949).

[1] H. Baumgärtner, Z. vergl. Physiol. *7*, 56, 120 (1928).

zellen)[1]. In der Richtung der Augenachse einfallendes Licht wird durch den Kristallkegel den Rhabdomeren zugeführt und, in Nervenerregung umgesetzt, von den 8 Sehzellen getrennt durch Nervenfasern abgeleitet.

Eine Verwertung des polarisierten Himmelslichtes für die Orientierung kann man sich so vorstellen, daß das Auge polarisierende Bestandteile in bestimmter Anordnung enthält. Auf der Suche nach diesen geforderten «Nicols» hatte ich zunächst die Kristallkegel in Verdacht. Doch fand mein Schüler Stockhammer bei mikroskopischer Untersuchung diese Erwartung nicht bestätigt.

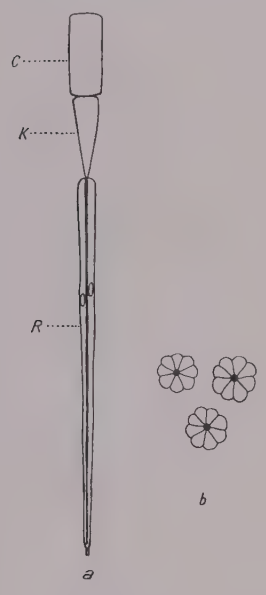


Abb. 4.

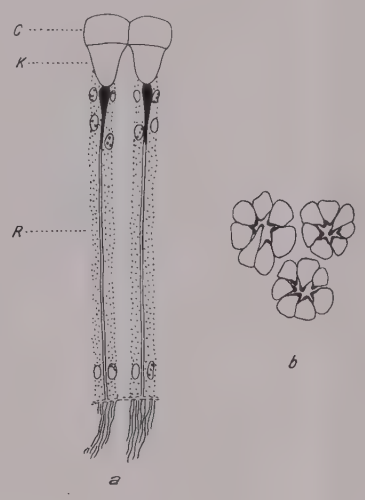


Abb. 5.

Abb. 4. *a* Ein Ommatidium (Einzelauge) aus dem zusammengesetzten Auge der Biene im Längsschnitt. Die umhüllenden Pigmentzellen sind nicht dargestellt. Der dioptrische Teil wird von der Cornea *C* und dem Kristallkegel *K* gebildet, der nervöse Teil von der Retinula *R*; schwarz das Rhabdom. *b* Querschnitt durch drei Ommatidien im nervösen Bereich, stärker vergrößert. Je 8 Retinulazellen stehen radiär um das Rhabdom (schwarz); schematisch.

Abb. 5. Längs- und Querschnittsbilder entsprechend Abb. 4, vom Auge einer Fliege (*Tabanus*). Deutlich gesonderte Rhabdomeren (schwarz). Nach Machatschka.

In einem Briefwechsel mit meinem Fachkollegen H. Autrum (Göttingen) äußerte dieser den Gedanken, daß die radiär angeordneten Rhabdomeren jedes Einzelauges, ihrer Stellung entsprechend, das Licht in verschiedener Richtung polarisieren könnten. Die Hypothese war bestechend. Sie veranlaßte mich, die angenommenen Verhältnisse in einem Modell zu verwirklichen, dessen Anwendung sich bei den Versuchen des Sommers 1949 als sehr nützlich erwies.

E. H. Land, Präsident der Polaroid Corporation in Cambridge, Mass., hat durch großzügige Überlassung eines reichen Materials von Polarisationsfolien meine Experimente wesentlich unterstützt, wofür ihm auch an dieser Stelle herzlich gedankt sei.

[1] Johann W. Machatschka, Mém. Soc. Zool. tschécoslovaque de Prague *4*, 90 (1936).

4. *Das künstliche Bienenauge*

Das erwähnte Modell wurde auf folgende Weise hergestellt: Ich schnitt aus einer Polarisationsfolie 8 gleichschenkelige Dreiecke aus, und zwar derart, daß die Schwingungsrichtung des Lichtes nach seinem Durchgang stets der Basis des Dreiecks parallel war (Abb. 6 *a*). Diese Dreiecke wurden auf einer Glasplatte in der Stellung der Retinulazellen radiär angeordnet und befestigt (Abb. 6*b*). Das Bild entspricht dem Querschnitt durch den nervösen Teil eines Einzelauges (vgl. Abb. 4, 5) und verwirklicht die von Autrum angenommenen polarisationsoptischen Eigen-

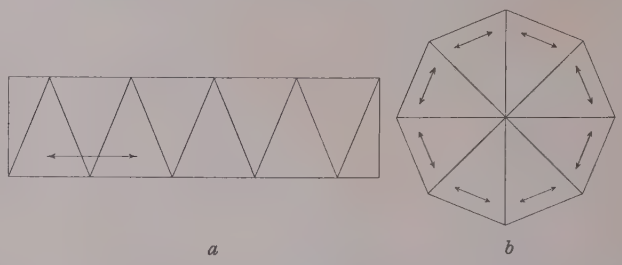


Abb. 6. *a* Polarisationsfolie mit Schnittmuster zur Herstellung der Sternfolie. *b* Sternfolie. – Die Doppelpfeile geben die Schwingungsrichtung des polarisierten Lichtes an.

schaften seiner 8 Bauelemente. Dieses Modell sei kurz als *Sternfolie* bezeichnet. Betrachtet man durch sie den blauen Himmel, so zeigt sich ein Helligkeitsmuster, wie ein solches beispielsweise in Abb. 7 nach einer photographischen Aufnahme wiedergegeben ist. Sein Zustandekommen ist leicht zu verstehen. Die Schwin-

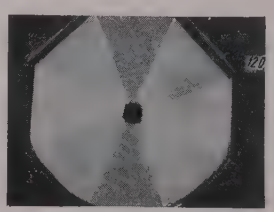


Abb. 7. Blick durch die Sternfolie gegen blauen Himmel. Photographische Aufnahme.

gungsebene des polarisierten Himmelslichtes stand an der betrachteten Himmelsstelle vertikal, also entsprechend den Schwingungsebenen der beiden liegenden Dreiecksfolien. Diese lassen daher das polarisierte Licht durchgehen und erscheinen hell. Die senkrecht zu ihnen angeordneten Dreiecke verhindern seinen Durchgang und erscheinen dunkel, wobei der Helligkeitskontrast um so größer sein wird, je stärker das Licht an der betreffenden Himmelsstelle polarisiert ist. Die schräggestellten Dreiecke zeigen eine mittlere Helligkeit, weil bei der gegebenen Lage der Schwingungsebenen nur eine Komponente des polarisierten Lichtes von ihnen durchgelassen wird.

Um die Sternfolie bequem handhaben zu können, wurde sie in ein achteckig ausgeschnittenes Fenster einer Sperrholzplatte eingesetzt und diese auf einem

Gestell drehbar und mit veränderlichem Neigungswinkel montiert (Abb. 8). Zwei Teilkreise und entsprechend angebrachte Zeiger gestatten, den Neigungswinkel und das Azimut, also die Höhe über dem Horizont und die Himmelsrichtung, nach der das künstliche Auge gerichtet ist, abzulesen.

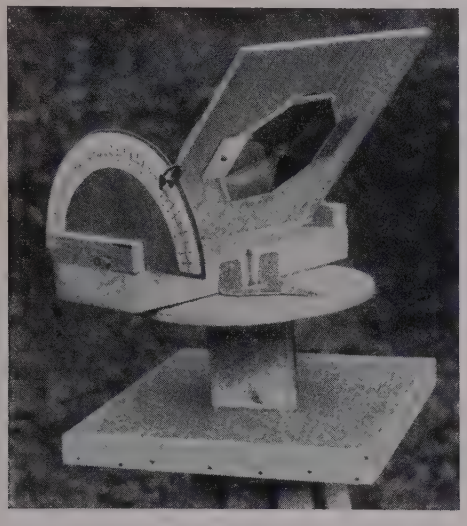


Abb. 8. Sternfolie, montiert.

Das Helligkeitsmuster der Sternfolie ändert sich mit dem Blick nach verschiedenen Himmelsrichtungen. Davon gibt Abb. 9 ein anschauliches Bild. Alle 8 Aufnahmen sind am 25. September 1949 um 10 Uhr (zwischen 9.56 und 10.06 Uhr MEZ.) bei wolkenlosem Himmel hergestellt. Die Himmelsrichtungen sind aus der Abbildung ersichtlich, die Höhe über dem Horizont war stets 45°. Man sieht, daß in einem ziemlich ausgedehnten Bereich um die Sonne (im Osten, Südost und Süden) die Polarisation fehlt oder sehr schwach ist und daß im übrigen jede Himmelsrichtung ihr typisches Muster hat, das – zu dieser Stunde – an keiner anderen Stelle wiederkehrt. Die Muster ändern sich aber natürlich, da sie vom Sonnenstand abhängig sind, mit der Tageszeit. Abb. 10 zeigt jeweils unter dem Muster, welches am 25. September um 10 Uhr im Norden, Nordost und Osten zu sehen war, die Aufnahmen derselben Himmelsstellen am gleichen Tage um 11 Uhr 30.

Wenn wir annehmen, daß die Biene das Helligkeitsmuster, das wir in unserem künstlichen Auge sehen und dessen Entstehung wir auch im wirklichen Bienenauge voraussetzen, in irgendeiner Weise wahrnimmt,[1] so kann sie sich tatsächlich auch ohne Sicht der Sonne am blauen Himmel nach dem Sonnenstande orientieren. Beim Flug zum Futterplatz ist jeder Augenteil nach einem bestimmten Bezirk des Himmels gerichtet und sieht dort das für diese Stelle bezeichnende Muster. Beim Tanz im Stock auf horizontaler Fläche braucht sich die Biene nur so einzustellen, daß das Muster des für sie sichtbaren blauen Himmelsfleckes dem Gedächtnismuster des beteiligten Augenbezirkes entspricht, um die Richtung eindeutig zu finden und sie auch den Stockgenossen zu übermitteln, die ihrem Schwänzellauf folgen. Es wird auch verständlich, daß schon ein kleines Stückchen blauen Himmels für die Orientierung genügt, denn es gibt nur *eine* Stellung der Biene[2], in welcher für die Einzelaugen, die gegen den blauen Fleck gerichtet sind, das erblickte Muster zum Erinnerungsmuster paßt.

Es ist nun die Frage, ob diese Vorstellung richtig ist. Wir prüfen, ob sie unsere Versuchsergebnisse im einzelnen verständlich macht.

5. *Parallelversuche mit tanzenden Bienen und mit dem künstlichen Bienenauge*

Über die Versuchstechnik sei folgendes gesagt: Zur Beobachtung der Tänze unter der Polarisationsfolie wurde der Beobachtungsstock horizontal gelegt und sein nach oben gerichtetes Glasfenster mit einer Sperrholzplatte bedeckt,

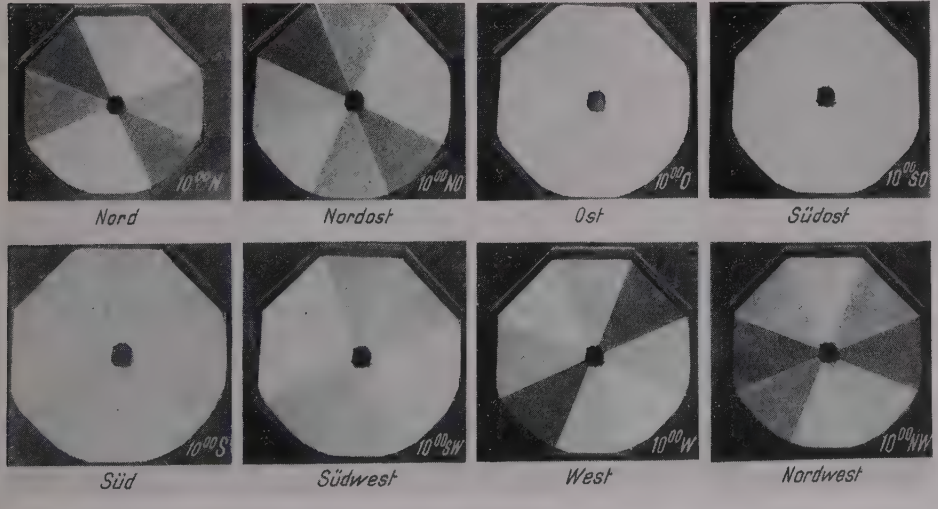


Abb. 9. Blick durch die Sternfolie nach 8 Himmelsrichtungen, Höhe über dem Horizont 45°. Photographische Aufnahme vom 25. September 1949, 10 Uhr. Die Wiedergabe des dritten Bildes (Ost) ist zu kontrastarm ausgefallen. Richtig wiedergegeben ist dasselbe Muster als letztes Bild rechts in der oberen Reihe von Fig. 10.

[1] Man braucht nicht anzunehmen, daß sie einige tausend Sternchen sieht. In unserer Netzhaut entsteht ein Punktmuster durch Tausende von Sinneszellen mit getrennter nervöser Ableitung. Unserer Wahrnehmung ist weder das Punktmuster, noch die durch zwei Augen bedingte Doppelnatur der Bilder erkennbar. Die zahlreichen Einzelerregungen werden zentral zu einem Raumbild verarbeitet. Ähnlich könnten die Muster im Bienenauge zu einem verhältnismäßig einfachen, aber von der Orientierung der Muster abhängigen Gesamteindruck verarbeitet werden – von dessen Beschaffenheit wir uns natürlich keine Vorstellung machen können.

[2] Von einer Ausnahme wird unten noch die Rede sein.

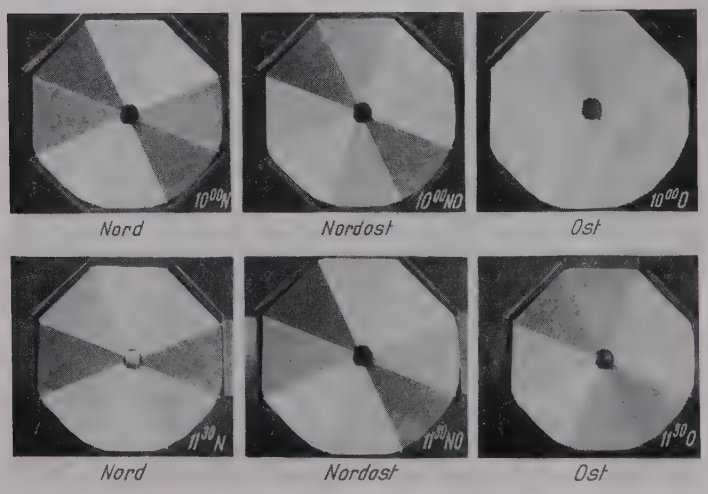


Abb. 10. In den 3 Bildern der oberen Reihe sind die ersten 3 Bilder der Abb. 9 nochmals wiedergegeben. Die Bilder der unteren Reihe sind Aufnahmen derselben Himmelsstellen am gleichen Tag, 1½ Stunden später.

in welcher über dem «Tanzboden» der Bienen[1] ein quadratisches Fenster von 20 cm Seitenlänge ausgeschnitten war. Über diesem Fenster war in einem kreisrunden, drehbaren Holzrahmen die Polarisationsfolie eingespannt (Abb. 11). Die Schwingungsebene des durchgelassenen Lichtes war bekannt, ihre Lage im Raum durch den Zeiger *Z* an einem Teilkreis abzulesen[2]. Um die runde Folie wurde ein dreiteiliger Schirm gestellt, so daß die Bienen nur nach *einer* Himmelsrichtung, nach Nord, Ost, Süd oder West, Ausblick hatten. Sie konnten in dieser Richtung durch die Polarisationsfolie einen Fleck blauen Himmels sehen, dessen Zentrum etwa 45° über dem Horizont lag und der eine Ausdehnung von angenähert 40° in der Breite und 30° in der Höhe hatte. Um bei den Tänzen auf der waagrechten Wabe die Richtung des Schwänzellaufes abzulesen, war über der Glasscheibe ein Netz aus weißen Zwirnsfäden in Nord–Süd- und Ost–West-Richtung und dazwischen in Winkelfolgen von 30° ausgespannt.

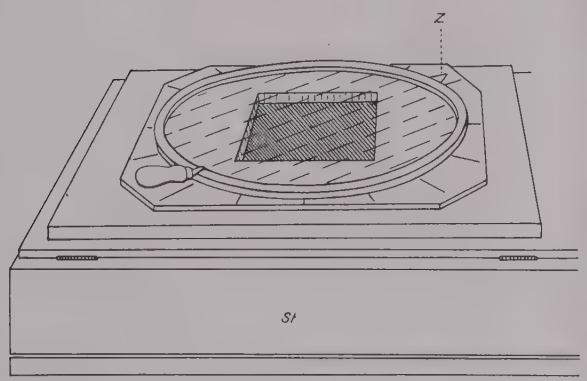


Abb. 11. Beobachtungsstock (*St*) in horizontaler Lage, über seinem Glasfenster eine Holzplatte mit quadratischem Ausschnitt, darüber die Polarisationsfolie in kreisrundem, drehbarem Holzrahmen. Die Richtung der unterbrochenen Striche entspricht der Schwingungsebene des durchgelassenen Lichtes, deren Einstellung im Raum an der Zeigerstellung (*Z*) abgelesen werden kann.

Diese Methoden haben sich bewährt und bedeuten eine Verbesserung gegenüber den mehr improvisierten Anordnungen des Vorjahres.

Um anschaulich zu machen, welche Wirkung nach unseren Vorstellungen die über den Stock gelegte Polarisationsfolie (kurz: *Deckfolie*) auf das Bienenauge hat, wurde eine entsprechende Folie in einem kreisrunden, drehbaren Holzrahmen in gleicher Stellung vor das künstliche Auge gesetzt. Dieser Apparat war unweit vom Bienenstock frei in der Wiese aufgestellt. Der Futterplatz, an dem unsere gezeichneten Tänzerinnen verkehrten, lag bei den meisten Versuchen 200 m entfernt, genau westlich vom Stock.

Bei der Schilderung der Versuche will ich diese zur besseren Übersicht in vier Kategorien teilen.

A. *Die Schwingungsrichtung des polarisierten Himmelslichtes wird durch die Deckfolie nicht verändert. Die Bienen weisen die Richtung zum Futterplatz*

Beispiel: Wir richten die Sternfolie, zunächst ohne Deckfolie, um 14 Uhr (7. September 1949) gegen den blauen Himmel im Osten. Es zeigt sich das in Abb. 12 oben festgehaltene Muster.

Setzen wir die Deckfolie vor, so ist alles Licht, welches die Sternfolie trifft, in bestimmter Richtung polarisiert. Das Muster erscheint dann in der Regel

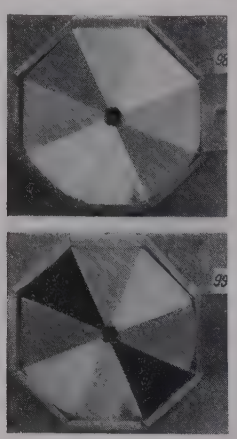


Abb. 12. Versuch am 7. September 1949, 14 Uhr. *Oben:* Osthimmel, durch die Sternfolie gesehen. *Unten:* Dasselbe, mit vorgesetzter Deckfolie, deren Schwingungsrichtung übereinstimmend mit der Schwingungsrichtung des polarisierten Himmelslichtes. Der dunkle Fleck im untersten Dreieck ist ein Baumwipfel. Photographische Aufnahme.

[1] So nenne ich den Wabenbereich, wo sich die Tänze abspielen und die unbeschäftigten Bienen zur Arbeit angeworben werden.

[2] Herrn Ing. R. Woksch, der mir bei diesen und anderen Versuchseinrichtungen mit technischen Einfällen und mit seiner gut eingerichteten Brunnwinkler Werkstätte, trotz spärlicher Freizeit, stets hilfsbereit zur Seite stand, sei auch hier aufrichtig gedankt.

verändert und wechselt kaleidoskopartig bei Drehung der Deckfolie. Es läßt sich aber leicht eine Stellung derselben finden, bei der das gleiche Muster – nur kontrastreicher[1] – erscheint, wie ohne die Deckfolie (Abb. 12 unten). Man erhält dieses übereinstimmende Muster dann, wenn die Schwingungsebene des von der Deckfolie durchgelassenen Lichtes mit der Schwingungsebene des polarisierten Himmelslichtes übereinstimmt. Es ist dies zugleich ein Verfahren, um rasch und einfach die Schwingungsebene des polarisierten Lichtes für eine bestimmte Himmelsrichtung mit einer für unsere Zwecke ausreichenden Genauigkeit festzulegen.

Wir lesen die Stellung der Deckfolie vor dem künstlichen Auge ab und *stellen die Deckfolie über dem Bienenstock ebenso ein.* Der Schirm gibt den Blick nach Osten frei. Nun wurde nacheinander bei 10 Tänzen, wie sie der Reihe nach zur Beobachtung kamen (also ohne Auswahl), die Richtung des Schwänzellaufes beobachtet. Der Futterplatz lag im Westen. Als Durchschnitt aus den 10 Tanzbeobachtungen ergab sich eine Richtungsweisung nach 6° südlich von West. Bei der Beurteilung dieses Fehlers ist zu beachten, daß er nicht den Bienen allein zur Last gelegt werden darf, sondern sich darin auch die Ungenauigkeiten meiner Tanzbeobachtungen und meiner Folieneinstellungen geltend machen.

Nach unserer Theorie ist folgende Sachlage gegeben: Beim Flug zum westlichen Futterplatz haben die Bienen das Muster des Osthimmels (Abb. 12) genau im Rücken. Beim Tanz im Stock stellen sie sich so ein, daß sie beim geradlinigen Schwänzellauf dieses Muster gleichfalls hinter sich haben – dann weisen sie die Richtung nach Westen. Bei der gegebenen Schirm- und Folienstellung sahen sie am Osthimmel das für diesen bezeichnende Muster und tanzten daher richtig.

Diese Überlegung gilt auch für jede andere Himmelsstelle. Wenn die Schwingungsrichtung des polarisierten Himmelslichtes durch die Deckfolie nicht verändert wird, behält das Muster seinen Charakter bei und die Richtungsweisung ist ungestört.

In 14 derartigen Versuchen (6 mit Nordhimmel, 5 mit Osthimmel, 1 mit Süd- und 2 mit Westhimmel) haben die Tänzerinnen *stets die wirkliche Richtung zum Futterplatz angezeigt, mit einem durchschnittlichen Fehler von 5,8°.*

Das gleiche Ergebnis hatte sich schon in 7 einschlägigen Versuchen des Sommers 1948 mit aller Deutlichkeit herausgestellt. Die Abweichungen der Richtungsweisung von der Richtung zum Futterplatz betrugen damals – gewiß infolge der ungenaueren Methodik – im Durchschnitt 15°.

[1] Kontrastreicher deshalb, weil das Licht unter der Deckfolie vollständig, das vom blauen Himmel kommende Licht aber nur teilweise polarisiert ist.

B. *Die Schwingungsrichtung des polarisierten Himmelslichtes wird durch die Deckfolie verändert. Die Bienen tanzen nach einer falschen Richtung*

Beispiel I: Am 5. September 1949 richtete ich das künstliche Auge gegen den blauen Himmel im Westen (bei den hier besprochenen Versuchen stets 45° über dem Horizont). Es zeigte sich das in Abb. 13 oben festgehaltene Muster. Bei vorgesetzter Deckfolie erschien das gleiche Muster, wenn die Schwingungsebene der Deckfolie auf 35° östlich von Nord eingestellt war. Nun drehte ich die Folie aus dieser Stellung um 30° heraus (auf das Azimut 5°). Es zeigte sich nun das im mittleren Bild wiedergegebene, *veränderte Muster.* Auf

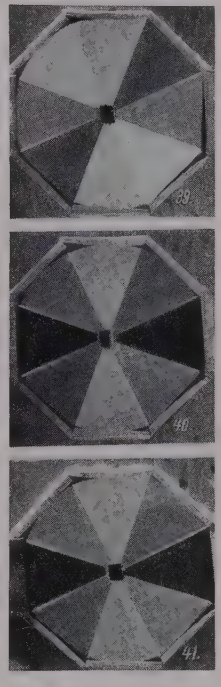


Abb. 13. Versuch am 5. September, 9.40–10.01 Uhr. *Oben:* Westhimmel, durch die Sternfolie gesehen. *Mitte:* Dasselbe mit vorgesetzter Deckfolie; Muster verändert. *Unten:* Das gleiche Muster zeigt sich ohne Deckfolie bei Einstellung der Sternfolie auf 34° nördlich von West. Photographische Aufnahme.

das gleiche Azimut wurde die *Deckfolie über dem Bienenstock* eingestellt und der Westhimmel sichtbar gemacht. Die nun beobachteten 10 Tänze der Bienen unter der Folie waren sehr bestimmt nach Südwest gerichtet und wiesen im Durchschnitt *35° südlich von West.* Nach Entfernung der Deckfolie vom künstlichen Auge war im Westen natürlich wieder das alte Muster zu sehen (Abb. 13 oben), doch erschien bei Drehung der Sternfolie (*ohne* die Deckfolie) am Himmel 34° nördlich von West das gleiche Muster, nur etwas weniger kontrastreich (Abb. 13 unten), wie es am Westhimmel *mit* der Deckfolie zu sehen war[1]. An keiner anderen Himmelsstelle kehrte dieses Muster wieder.

[1] Das bedeutet, daß das polarisierte Himmelslicht an dieser Stelle, 34° nördlich von West, die Schwingungsebene hatte, die ich dem Licht vorher bei der nach Westen gerichteten Sternfolie durch die vorgesetzte Deckfolie künstlich gegeben hatte.

Somit war nach unseren Vorstellungen folgende Lage gegeben: Die Bienen sahen beim Flug nach dem Futterplatz das Muster der Abb. 13 oben im Westen genau vor sich, das Muster der Abb. 13 unten um 34° rechts vor sich. Im Versuch wurde ihnen dieses letztere Muster gezeigt, und zwar im Westen. Ich hatte sozusagen das Muster für sie am Himmel 34° westlich verlagert. Im Freien hatten sie sich auf dem Wege zum Futterplatz 34° nach links von diesem Muster zu halten. Beim Tanz wiesen sie die Richtung 35° links vom Muster, die Abweichung betrug also 1° (vgl. Abb. 14).

Es sei betont, daß mir bei fast allen derartigen Versuchen während der Beobachtung der Tänze die theoretisch zu erwartende Richtung derselben nicht bekannt war. Die gute Übereinstimmung der beobachteten Tanzrichtungen mit der Theorie festigte in mir die Überzeugung, auf dem rechten Wege zu sein.

Diese Übereinstimmung bestätigte sich auch, wenn das Ausmaß der Foliendrehung ein anderes war, und auch dann, wenn das Ausmaß der Musterverlagerung relativ zur Foliendrehung ganz anders war. Hierfür noch ein Beispiel:

Beispiel II: Am gleichen Tage, am 5. September, 14.40 Uhr, zeigte ich den tanzenden Bienen am Westhimmel durch Drehung der Deckfolie um etwa 60° aus der Ausgangsstellung ein Muster, das zur Zeit bei Betrachtung des Himmels durch die Sternfolie (ohne Deckfolie) 47° östlich von Nord in Erscheinung trat. Die Bienen wiesen unter der entsprechend eingestellten Folie die Richtung 32° südlich von Ost, was mit einer Abweichung von 11° der Erwartung entspricht (Abb. 15).

In 48 derartigen Versuchen wurden alle 4 Himmelsrichtungen sowohl vormittags wie nachmittags herangezogen und der Winkelbetrag sowie die Richtung der Foliendrehung systematisch variiert. Die Abweichung der beobachteten Tanzrichtung von der theoretisch erwarteten betrug *im Durchschnitt* bei diesen 48 Versuchen 8,3°, *im Höchstfalle* 20°. Ein großer Teil

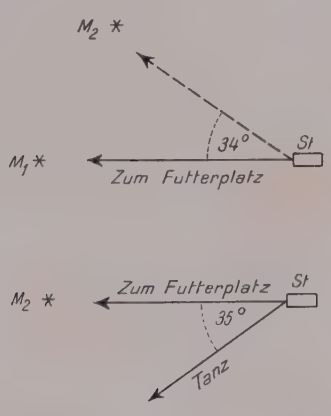


Abb. 14. Derselbe Versuch wie Abb. 13. *Oberes Bild:* Die Bienen sahen (nach unserer Theorie) beim Flug vom Stock (*St*) zum westlich gelegenen Futterplatz vor sich das Muster M_1 (vgl. Abb. 13, oben), 34° rechts vor sich das Muster M_2 (Abb. 13 unten). *Unteres Bild:* Als ihnen das Muster M_2 im Westen gezeigt wurde, wiesen sie die Richtung zum Futterplatz 35° südlich von West.

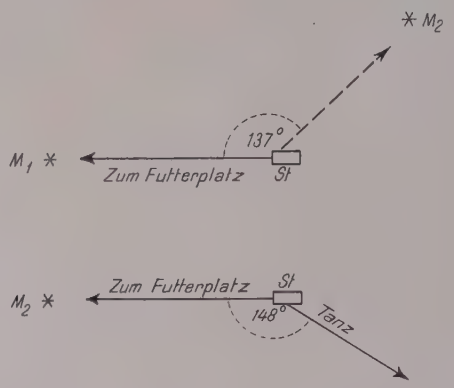


Abb. 15. Versuch vom 5. September 1949, 14.40–14.52 Uhr. Erklärung entsprechend Abb. 14. M_1 Muster des Westhimmels in der Sternfolie. M_2 im unteren Bild: durch Vorsetzen der Deckfolie verändertes Sternfolienmuster; im oberen Bild: dasselbe Sternfolienmuster, ohne Deckfolie am nordöstlichen Himmel.

der Versuche ist durch photographische Aufnahmen belegt. Doch will ich hier nicht mehr Bilder bringen, als notwendig sind, um Methode und Ergebnisse verständlich zu machen.

C. *Die Schwingungsrichtung des polarisierten Himmelslichtes wird durch die Deckfolie verändert. Die Bienentänze sind desorientiert*

Beispiel: In der schon mehrfach herangezogenen Versuchsreihe vom 5. September 1949 erschien um 11 Uhr in der nach Westen gerichteten Sternfolie ein Muster, welches durch die vorgesetzte Deckfolie abgeändert wurde. Ich brachte die Polarisationsfolie über dem Bienenstock in dieselbe Stellung wie die Deckfolie vor dem künstlichen Auge und gab den Blick nach Westen frei. Die Bienen tanzten *völlig desorientiert.* Sie wechselten die Richtung des Schwänzellaufes während des Tanzes in regelloser Weise. Beim Absuchen des Himmels mit der Sternfolie stellte sich heraus, daß das Muster, das ich durch Vorschalten der Deckfolie erzeugt hatte, zur Zeit *an keiner Stelle des Himmels zu finden war.*

Unter insgesamt 83 Versuchen waren die Tänze der Bienen in 16 Versuchen desorientiert. Fünfmal war das mit der Deckfolie hergestellte Muster an keiner Stelle des Himmels zu erkennen, in 10 Fällen ließ sich ein entsprechendes Muster finden, aber *außerordentlich blaß* und stets noch kontrastärmer als das in Abb. 16 unten wiedergegebene Bild. Daß die Bienen das kontrastreiche mit dem blassen, für unser Auge kaum erkennbaren Muster nicht identifiziert haben, ist verständlich.

In Abb. 16 gebe ich die photographischen Belege für einen Versuch wieder, bei dem die Richtungsweisung eben noch möglich war. Die Bienen

hatten durch die Polarisationsfolie Ausblick nach Süden. Das obere Bild zeigt, wie die nach Süden gerichtete Sternfolie erschien, wenn die Deckfolie in gleicher Orientierung wie über dem Bienenstock vorgeschaltet war. Ohne Deckfolie war das gleiche Muster,

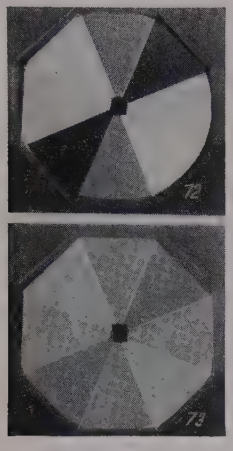


Abb. 16. Versuch vom 6. September, 13.27–13.36 Uhr. *Oberes Bild:* Südhimmel durch die Sternfolie gesehen, mit vorgesetzter Deckfolie. *Unteres Bild:* Das gleiche Muster, kontrastarm, zeigt sich ohne Deckfolie 30° nördlich von West. Richtungsweisung der Bienen bei Einstellung der Deckfolie wie im oberen Bild 45,5° östlich von Süd, zögernd und unsicher. Abweichung von der theoretisch zu erwartenden Weisung 15,5°. Photographische Aufnahme.

aber kontrastarm, 60° westlich von Nord am Himmel erkennbar (unteres Bild), sonst nirgends. Die Bienen tanzten statt nach West nach Südost mit einer Abweichung von 15,5° von der theoretisch erwarteten Richtung. Ihre Unsicherheit war nicht nur aus dem verhältnismäßig großen Fehler zu ersehen; es fiel ihnen auch sichtlich schwer, sich für eine Tanzrichtung zu entscheiden; sie drehten sich, entgegen dem sonstigen Brauch, oft mehrmals suchend im Kreise, bevor sie wie mit plötzlichem «Entschluß» eine bestimmte Laufrichtung einschlugen. Überdies entfielen auf die 10 beobachteten richtungsweisenden Tänze 4 desorientierte Tänze. Ein entsprechendes Verhalten habe ich in insgesamt 14 Versuchen beobachtet[1], und *stets bei kontrastarmen Himmelsmustern.* Die deutliche Beziehung zwischen der Klarheit des Musters und der Klarheit der Richtungsweisung war mir besonders eindrucksvoll.

Es bleibt noch ein Versuch mit desorientierten Tänzen zu besprechen, bei dem die Verhältnisse etwas anders lagen. Die Sternfolie war nach Norden gerichtet und zeigte das Muster der Abb. 17, oben. Die Deckfolie wurde so vorgeschaltet, daß die Schwingungsebene des durchgegangenen Lichtes zur Schwingungsebene des polarisierten Himmelslichtes senkrecht stand. Dadurch wurde das Muster sehr dunkel und kontrastarm (mittleres Bild). Obwohl nach Entfernung der Deckfolie an einer anderen Himmelsstelle das gleiche Muster ziemlich deutlich in Erscheinung trat (unteres Bild), waren die Bienen desorientiert – vermutlich deshalb, weil für ihre Augen das erzeugte Muster zu dunkel und kontrastarm war.

Im Sommer 1948 hatte ich bei allen Versuchen, in welchen die Schwingungsrichtung des polarisierten Himmelslichtes durch die Folie um einen Betrag von 55° oder mehr gedreht war, desorientierte Tänze erhalten. Dieses Ergebnis hat sich bei den Versuchen des Sommers 1949 nicht allgemein bestätigt. Der Grund dürfte hauptsächlich darin zu suchen sein, daß ich 1948 eine dunklere Polarisationsfolie verwendet habe, wodurch es bei Änderung der Schwingungsebene schon früher zu einer so weitgehenden Verdunkelung des Musters kam, wie im zuletzt besprochenen Versuch.

D. *Die Schwingungsrichtung des polarisierten Himmelslichtes wird durch die Folie verändert oder nicht verändert. Die Tänze weisen nach zwei verschiedenen Richtungen.*

Als *Beispiel* bringe ich einen Versuch vom 7. September 1949, den einzigen dieser Art, den ich photographisch belegen kann. Abb. 18 zeigt links oben den Nordhimmel, durch die Sternfolie betrachtet, um 17 Uhr. Die Deckfolie wurde vorgeschaltet und so eingestellt, daß das Muster der Abb. 18, links unten, entstand. Die Deckfolie über dem Beobachtungsstock wurde ebenso orientiert und der Blick nach Norden freigegeben. Die Bienen tanzten teils nach Westen, wo der Futterplatz lag, und teils nach Osten. Manche änderten die Richtung des Schwänzellaufes in regelmäßigem Wechsel zwischen West und Ost beim selben

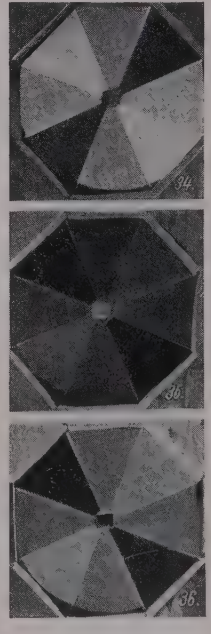


Abb. 17. Versuch vom 3. September, 15.38–15.47 Uhr. *Oberes Bild:* Nordhimmel durch die Sternfolie gesehen. *Mittleres Bild:* Dasselbe mit vorgesetzter Deckfolie, Muster verändert und stark verdunkelt und kontrastarm. *Unteres Bild:* Dasselbe Muster, aber kontrastreich, erscheint in der Sternfolie (ohne Deckfolie) 22° südlich von Ost. Unter der Deckfolie in der Stellung wie beim mittleren Bild tanzten die Bienen desorientiert. Photographische Aufnahme.

[1] Sie sind, da eine Richtungsweisung vorlag, im Abschnitt B mit einbezogen.

Tanz. Mit der Sternfolie war, nach Entfernung der Deckfolie, das Muster der Abb.18, links unten, an zwei Stellen des Himmels zu erkennen: 20° westlich von Nord (Abb.18, rechts oben) und 16° westlich von Süd (Abb.18, rechts unten). Die Bienen sahen, nach unserer Annahme, auf dem Flug zum Futterplatz dasselbe Muster rechts vor sich am Nordhimmel, und links am Südhimmel. Bei unserer Versuchsanordnung konnten sie vom Stock aus nicht erkennen, welches von beiden sichtbar war. Es schien ebenso richtig, nach links vom Muster zu weisen wie nach rechts – und sie haben beides getan.

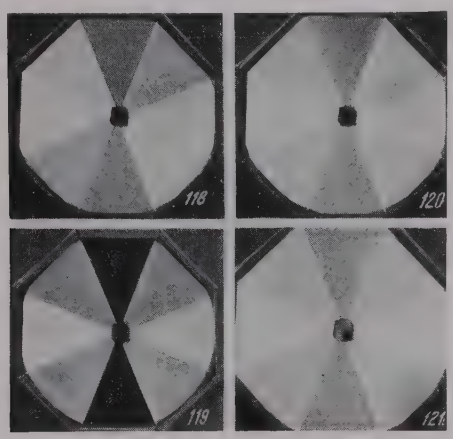


Abb. 18. Versuch vom 7. September, 17.12–17.21 Uhr. *Links oben:* Nordhimmel, durch die Sternfolie betrachtet. *Links unten:* Dasselbe mit vorgesetzter Deckfolie. *Rechts oben:* Dasselbe Muster zeigte sich in der Sternfolie, ohne Deckfolie, 20° westlich von Nord und (*rechts unten*): 16° westlich von Süd. Spiegelbildliche Richtungsweisung nach West und Ost. Photographische Aufnahme.

Unter den 83 Versuchen mit der Sternfolie waren 5, bei welchen die Bienen zwei verschiedene Richtungen angaben – in 4 Fällen waren es diametral entgegengesetzte Richtungen. Die Prüfung des Himmels mit der Sternfolie zeigte, daß in allen 5 Versuchen das gegebene Muster an *zwei* Himmelsstellen in Erscheinung trat. In den 4 Fällen mit spiegelbildlicher Weisung waren es einander angenähert gegenüberliegende Orte am Himmel. Ob hierbei die Schwingungsrichtung des polarisierten Himmelslichtes durch die Deckfolie verändert wird oder nicht, ist nebensächlich. Das wesentliche ist, daß hier die Richtung zum Futterplatz durch das gezeigte Muster nicht einsinnig, sondern doppelsinnig bestimmt ist und daß die Tänzerinnen in der gegebenen Lage keine Orientierungsmarken haben, um zwischen beiden Möglichkeiten richtig zu entscheiden. Ich erhielt die gleichen spiegelbildlichen Tänze auch *ohne* Polarisationsfolie, als ich den Tänzerinnen auf der waagrechten Wabe um die Zeit vor Sonnenuntergang den blauen Himmel im Norden sichtbar machte.

Es war naheliegend, nach Abschluß dieser Versuchsreihen auch die Ergebnisse über die Änderung der Tanzrichtung unter der Polarisationsfolie, die ich im vorangegangenen Sommer erhalten hatte, mit der Sternfolie zu überprüfen. Doch war dies wegen der vorgeschrittenen Jahreszeit nur mehr für 16 Versuche des Sommers 1948 möglich. Bei diesen hat sich herausgestellt, daß die 1948 verzeichnete Tanzrichtung so war, wie sie – nach Beobachtung des Himmels durch die Sternfolie zur entsprechenden Jahres- und Tageszeit 1949 – nach unserer Theorie zu erwarten war.

Durch diese Befunde glaube ich bewiesen zu haben, daß für die Ausrichtung des Tanzes unter den gegebenen Bedingungen *die Schwingungsebene des polarisierten Himmelslichtes bestimmend ist und daß also die Biene die Fähigkeit hat, die Polarisation des Himmelslichtes zu analysieren.*

Ob hierbei wirklich die radiär angeordneten Netzhautzellen innerhalb eines Ommatidiums, wie die Dreiecksfolien in unserem Modell, diese Aufgabe erfüllen, oder ob zur Analyse der Schwingungsebene mehrere Einzelaugen zusammenwirken müssen, kann aus den oben besprochenen Versuchen nicht entschieden werden. Sie sind auf beiderlei Weise erklärbar. Doch erscheint die zweite Annahme, daß die Ommatidien untereinander polarisationsoptisch verschieden sind und in Gruppen zusammenwirken müssen, willkürlich und durch keine morphologischen Befunde begründet. Dagegen kann sich die erste Annahme, wonach die Analyse innerhalb der Einzelaugen erfolgt, auf die radiäre Anordnung der Sehzellen stützen. Eine innere Feinstruktur dieser Zellen, die eine Polarisation des Lichtes in verschiedenen, ihrer Stellung entsprechenden Ebenen bewirkt, ist einleuchtend und stünde mit bekannten Tatsachen in Einklang.

Eine experimentelle Entscheidung zugunsten dieser Annahme scheint Autrum, der von ganz anderer Seite an das Problem heranging, gelungen zu sein. Mit seiner freundlichen Erlaubnis kann ich aus brieflichen Mitteilungen vom 18. und 29. November 1949 folgendes von seinen Ergebnissen mitteilen: 1. Bei Verwendung polarisierten Lichtes ergeben sich bei Ableitung von Einzelommatidien aus einer Änderung der Schwingungsrichtung keine Änderungen des Aktionspotentials. Daraus ist zu schließen, daß die verschieden polarisierenden Teile in einem Ommatidium vereinigt sind. 2. Polarisiertes Licht ruft im Einzelauge einen größeren Effekt hervor als nichtpolarisiertes Licht gleicher Intensität. Um mit letzterem einen gleich hohen Aktionsstrom zu bekommen wie mit polarisiertem Licht, muß man seine Intensität um etwa 40% höher machen. Autrums Erklärung: Bei polarisiertem Licht bekommen die Zellen, die auf die Schwingungsrichtung ansprechen, die volle Intensität, und geben daher ein höheres Potential als bei nichtpolarisiertem Licht, wo ein Teil der Lichtenergie nicht zur Wirkung kommt. Daß bei Anwendung polarisierten Lichtes ein Teil der radiär gestellten Zellen nichts liefert, «macht sich im Gesamtaktionsstrom

nicht bemerkbar, da sie elektrisch alle parallel liegen und stets der maximale Aktionsstrom abgegriffen wird. In jedem Falle zeigt dieser Versuch, daß polarisiertes und nicht polarisiertes Licht auf das Einzelommatidium verschieden wirkt».

Es sei schließlich darauf hingewiesen, daß die Analyse des polarisierten Lichtes innerhalb des Einzelauges auch auf etwas andere Weise denkbar ist als durch Erzielung von Intensitätsstufen, wie in unserem Augenmodell. Ein Beispiel solch anderer Möglichkeit bietet unser eigenes Sehorgan, das ja auch in bescheidenem Maße die Fähigkeit hat, die Schwingungsebene linear polarisierten Lichtes zu erkennen. Betrachtet man ein hell beleuchtetes weißes Papier durch ein Polarisationsfilter, so erscheint an der fixierten Stelle ein sehr blasses Farbkreuz, das Haidingersche Büschel, bestehend aus einer gelben Doppelgarbe und, zu seiten ihrer Einschnürung, zwei bläulichen Flecken (Abb. 19). Bei Drehung der Polarisationsfolie dreht sich auch die Büschelfigur, und zwar so, daß eine senkrecht zur Garbenachse durch die blauen Flecken gelegte Linie stets der Schwingungsrichtung des polarisierten Lichtes entspricht. Da das blaue Himmelslicht nur teilweise polarisiert ist, ist das Haidingersche Büschel bei Betrachtung des blauen Himmels so lichtschwach, daß es nur von besonders empfindlichen Personen gesehen wird. Solche sind imstande, an der Stellung des Farbkreuzes die Schwingungsebene des polarisierten Himmelslichtes zu erkennen, allerdings – da die Erscheinung auf die Fovea centralis beschränkt ist – nur an der jeweils fixierten Stelle und nicht, wie die Bienen, gleichzeitig über das ganze Himmelsgewölbe[1].

[1] Erst nach der Niederschrift dieser Arbeit wurde ich mit einer Mitteilung von O. Cords bekannt (Optik Bd. 2, 1947, 423), dem es gelungen ist, die Erscheinung des Haidingerschen Büschels durch ein Modell künstlich zu entwerfen. Das Gerät besteht erstens aus einer Polarisationsfolie zur Erzeugung des polarisierten Lichtes; zweitens aus einem «Sternanalysator», der meiner Sternfolie gleicht, nur daß die Foliendreiecke durch Abstände getrennt sind und sich nur mit den Spitzen berühren (die Sternfolie war also, zu einem verwandten Zweck, bereits erfunden); und drittens einem «Sternkompensator» aus einem doppelbrechenden Medium, z. B. Glimmerplättchen, das bei «Diagonalstellung» zwischen parallelen Polarisatoren einen gelben Farbton entstehen läßt. Der Sternkompensator wird zwischen den beiden anderen Teilen so angeordnet, daß sich vor jedem Sektor des Analysators ein Sektor des doppelbrechenden Mediums in «Diagonalstellung» befindet. Mit solchem Gerät läßt sich das Bild des Haidingerschen Büschels in typischer Färbung und Gestalt erzeugen und die Abhängigkeit seiner Orientierung von der Schwingungsebene des einfallenden polarisierten Lichtes demonstrieren. Wo das geforderte doppelbrechende Medium im menschlichen Auge wirksam ist, bleibt offen. Den «Sternanalysator» vermutet Cords in der lichtempfindlichen Zone der Netzhautzapfen.

Auch zwei Arbeiten von G. Boehm (Acta Ophthalmologica *18*, 2. 109 und 143 [1940]) sind in diesem Zusammenhange bemerkenswert. In der ersten beschreibt er eine Apparatur mit der die Haidingerschen Büschel für jeden leicht sichtbar zu machen sind und liefert einen Beitrag zum Verständnis der Erscheinung. In der zweiten beschreibt er als neuartiges, entoptisches Phänomen Polarisationsbüschel im Gebiet der Netzhaut*peripherie*, die durch eine Streuung des Lichtes in der Retina zustande kommen und nur unter gewissen, künstlich hergestellten Bedingungen sichtbar werden.

6. *Versuche bei geschlossener Wolkendecke*

In früheren Versuchen über die Richtungsweisung hat sich ergeben, daß die Bienen auch bei geschlossener Wolkendecke den Sonnenstand erkennen[1]. Dies scheint aber nur dann möglich zu sein, wenn sie nach der Himmelsrichtung, wo die Sonne hinter den Wolken steht, freien Ausblick haben. Auf welche Weise sie dazu imstande sind, darüber bestehen Vermutungen, deren Diskussion verfrüht wäre.

Die Polarisation des Himmelslichtes kann hierbei nichts helfen. Denn Wolken depolarisieren das Licht. Ich habe mich auch in vielen Versuchen immer wieder überzeugt, daß die Bienen desorientiert tanzen, wenn man ihnen nach einer Richtung, wo die Sonne *nicht* hinter den Wolken steht, den Blick auf bewölkten Himmel frei gibt.

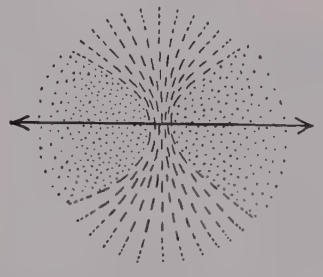


Abb. 19. Das *Haidingersche Büschel*. Die Doppelgarbe erscheint gelblich, die beiden punktiert dargestellten Flecken zu seiten ihrer Einschnürung bläulich. Die Figur hat eine bestimmte Orientierung zur Schwingungsrichtung des polarisierten Lichtes, die durch den Doppelpfeil angegeben ist (Skizze nach der farbigen Abbildung von E. Holm, Arch. Ophthalmol. *108* [1922], dort S. 28).

Um so mehr war ich überrascht, zu sehen, daß sie sofort eine sehr bestimmte Richtung weisen, wenn man ihnen bei vollständig geschlossener Wolkendecke einen Teil der Wolken, z. B. am Nordhimmel, *durch die Polarisationsfolie* sichtbar macht. So zeigten sie bei einem Versuch am 21. September 1949 um 15 Uhr in 10 beobachteten Tänzen durchschnittlich die Richtung 50° südlich von West. Der Futterplatz lag im Westen. Die gegen den bewölkten Himmel gerichtete Sternfolie ließ kein Muster erkennen. Wenn ich aber die Deckfolie in derselben Orientierung, wie über dem Bienenstock, vor der Sternfolie anbrachte, erschien ein Muster, das – nach Feststellungen an vorangegangenen klaren Tagen – um 15 Uhr bei blauem Himmel etwa 45° östlich von Nord mit der Sternfolie zu sehen sein mußte. Wenn sich die Bienen gedächtnismäßig danach richteten, mußten sie 135° nach links von diesem, im Norden sichtbar gemachten Muster weisen, also 45° südlich von West. Die Abweichung betrug 5°.

Ich konnte im Laufe des Septembers 12 solche Versuche durchführen. In 9 Fällen wiesen die Bienen eine bestimmte Richtung, die im Durchschnitt angenähert um 10° von der Richtung abwich, die bei blauem Himmel zu erwarten gewesen wäre. In 3 Fällen tanz-

[1] K. v. Frisch, Naturwissenschaften *35*, 18 (1948).

ten sie desorientiert. Zu diesen Zeiten wäre das erzeugte Muster bei blauem Himmel mit der Sternfolie nirgends zu sehen gewesen.

Es wird mich nicht wundern, wenn diese Mitteilung mit Zweifel aufgenommen wird. Denn sie besagt, daß die den Himmelsstellen zugeordneten Muster nicht nur kurzfristig, vom Ausflug bis zur Heimkehr, sondern über Tage im Gedächtnis behalten werden, und daß die Bienen hierbei – wenn ich so sagen darf – die Tageszeit einkalkulieren. Denn das Muster, das um 10 Uhr für den Nordhimmel bezeichnend ist, ist es um 12 Uhr keineswegs. Doch darf ich daran erinnern, daß die Bienen ein vorzüglich entwickeltes Zeitgedächtnis haben, dessen biologische Bedeutung sich hier von einer neuen Seite zeigt.

7. *Die Sonne als Kompaß in unbekannter Landschaft*

Die eben besprochenen Erfahrungen veranlaßten mich zur Durchführung eines Versuchs, den ich schon lange geplant aber immer hinausgeschoben hatte, weil ich an sein Gelingen doch nicht recht glaubte.

Die numerierten Bienen des Beobachtungsstockes in Brunnwinkl waren seit einer Reihe von Tagen auf einem Tischchen 200 m westlich vom Stock gefüttert worden. Ein wenig Anisöl auf der Unterlage des Futterschälchens gab der Stelle eine geruchliche Note. Am Morgen des 24. September 1949 wurde der Beobachtungsstock vor Flugbeginn von seinem bisherigen Platz an einen 5 km entfernten Platz gebracht, der durch den See vom früheren Flugbereich getrennt und den Bienen unbekannt war. *Das Landschaftsbild war damit völlig verändert.*

In den ausgedehnten Wiesenflächen um den neuen Aufstellungsort wurden 4 gleiche Futtertischchen aufgestellt, jedes 200 m vom Stock entfernt nach West, Ost, Nord und Süd. Auf jedes Tischchen setzten wir ein Zuckerwasserschälchen auf einer Unterlage mit zwei Tropfen Anisöl. Um 8.25 Uhr wurde der Stock geöffnet und die Bienen begannen vorzuspielen. In den folgenden 3 Stunden war bei jedem Tischchen ein Beobachter, der alle Bienen, die sich an das Schälchen setzten, sofort abfing. Eine Alarmierung weiterer Bienen war dadurch ausgeschlossen, alle Ankömmlinge kamen aus eigenem Antrieb.

Von den 4 Plätzen war der südwärts gelegene dadurch begünstigt, daß ein mäßiger Südwind den Duft von dort in der Richtung zum Stock trug. Hier setzten sich in den 3 Beobachtungsstunden 5 von den numerierten Bienen ans Schälchen, am Nord- und Osttischchen je eine, im Westen aber 20. Von den insgesamt 29 gezeichneten Bienen, die am vorangegangenen Nachmittag am Brunnwinkler Futterplatz im Westen des Stockes verkehrt hatten, waren 27 in der fremden Gegend wieder an einem Schälchen erschienen, davon 20 am Westplatz.

Nur die Sonne konnte ihnen hierbei als Kompaß gedient haben. Aber die stand im Südosten, während sie sich bei den letzten Flügen zum Futterplatz am Tage zuvor dem westlichen Horizont genähert hatte. So lehrt auch dieser Versuch, daß die Bienen bei der Orientierung nach dem Sonnenstand die Tageszeit berücksichtigen.

8. *Orientierung nach polarisiertem Licht bei Ameisen*

Santschi hat zuerst erkannt und überzeugend bewiesen, daß Ameisen die Stellung der Sonne oder des Mondes benützen können, um sich zu orientieren und bei ihren Wanderungen eine bestimmten Richtung einzuhalten. Er entdeckte aber auch[1], daß sie die gewählte Richtung selbst dann beibehalten können, wenn sie nur ein Stück blauen Himmels über sich sehen. Er glaubte, daß sie am hellen Tag die Sterne wahrnehmen könnten und sich nach ihnen richten. Ich sprach die Vermutung aus[2], daß ein Versuch mit der Polarisationsfolie zu einer anderen Erklärung führen würde.

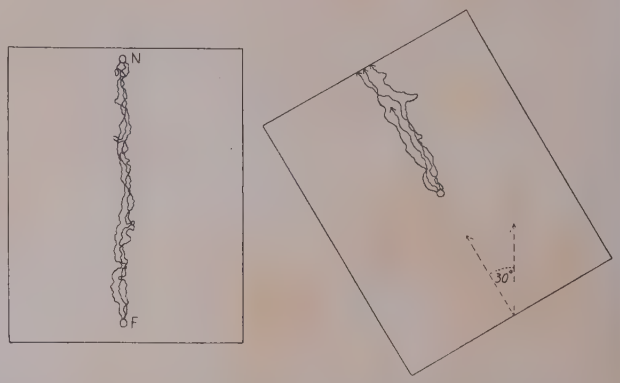


Abb. 20. *Linkes Bild:* Laufspuren dreier Ameisen unter der Polarisationsfolie, bei blauem Himmel, vom Nest *N* zum Futterschälchen *F*. Eine vierte Ameise nahm denselben, nicht verzeichneten Weg. *Rechtes Bild:* Rückweg der 4 Ameisen nach Versetzung des Schälchens und Drehung der Folie um 30°. Versuch von I. Schifferer.

Solche Experimente sind inzwischen von meiner Schülerin Ilse Schifferer an *Lasius niger* durchgeführt worden. In Abb. 20 sind die Laufspuren dreier Ameisen verzeichnet, die unter blauem Himmel, aber von einer Polarisationsfolie überdeckt, von ihrem Nest *N* zum Futterschälchen *F* marschierten. Eine vierte verfolgte denselben Weg, ohne daß die Spur nachgezeichnet werden konnte. Sodann wurde das Futterschälchen mit den 4 Ameisen seitlich versetzt; auf dem gefegten Sandboden fanden sie keine Geruchsspuren. Die Polarisationsfolie wurde, *um 30° gedreht*, zentral über das Schälchen gesetzt. Die Ameisen nahmen bei der Rückkehr die eingetragenen Wege.

Über Einzelheiten ihrer zahlreichen Versuche wird Ilse Schifferer später selbst berichten. Das Beispiel

[1] F. Santschi, Mém. Soc. vaudoise des Sci. nat. 137 (1923).
[2] K. v. Frisch, Exper. *5*, 142 (1949).

sollte nur zeigen, daß es sich bei der Orientierung nach polarisiertem Licht nicht um eine Spezialität der Bienen, sondern um eine weiter verbreitete Erscheinung handelt.

Summary

(1) Bees returning home from a good source of honey inform their hive mates by means of tail-wagging dances as to the direction in which the feeding-place lies. When dancing on a horizontal surface they point directly thereto by a tail-wagging run in the given direction. They are able to orientate themselves by the position of the sun and can do this when they see only a piece of blue sky.

(2) The blue light of the sky is partially polarized, and its plane of vibration depends on the sun's position. When the plane of vibration is altered artificially, then the direction of the bees' dance is altered too.

(3) According to a hypothesis suggested by Autrum, the eight radially arranged sensory cells in each single eye (ommatidium) of the bee's compound eye might enable the analysis of polarized light.

(4) A model was constructed of radially arranged polaroid sheets (radial model) corresponding to the theoretically postulated situation. Upon regarding the blue sky through this artificial single bee's eye a characteristic pattern was observed for every part of the sky, which is dependent on the position of the sun and therefore changes with the time of day. If the bee is able to perceive the differences in pattern, it can orientate itself upon a piece of blue sky unambiguously in space according to the position of the sun.

(5) In parallel experiments with dancing bees and with the artificial bee's eye the latter, and likewise the beehive, was covered with likewise orientated polaroid sheets (covering sheets). The bees had a view through the sheet of a region of the sky toward which the artificial eye also was directed. The following was observed under these circumstances:—

(a) If the covering sheet is so directed that it does not alter the plane of vibration of the polarized light from the sky, then the bees under the sheet still point correctly to the direction of the feeding place. In the artificial eye the pattern is unchanged in this position of the covering sheet, exhibiting only a more marked contrast.

(b) When the pattern in the artificial eye is altered through the covering sheet, one usually finds this artificially produced pattern, once the covering sheet is removed, in some other part of the sky. Under a correspondingly orientated folio the bees point in a false direction. This is understandable on the supposition that under the covering sheet in their eye the same alteration of pattern occurs as in the artificial eye. In their dance they make the same angle to the direction where the altered pattern is shown as they have to take to the natural locus of the pattern in their flight to the feeding ground (cf. Fig. 14, 15).

(c) If the pattern produced with the covering sheet is not realized in any part of the sky without the covering folio, the bees dance disorientatedly.

(d) If the pattern is realized in two opposite parts of the sky, the bees point in two converse directions.

These experiments prove that, under the given circumstances, the plane of vibration of the polarized light of the sky determines the direction of the dances, and that the bee is able to analyse the polarization of the sky's light.

(6) Light from the clouds is not polarized. If one directs the artificial eye against a cloud surface, a pattern only appears when the covering sheet is in place. Under these conditions the bees only point in a certain direction when a cloud is made visible to them through a polarizing sheet. They then take the angle to the pattern presented that they would have to take to the locus of this pattern at the given time under a blue sky. This means that they retain the pattern in memory for days and take account of the alteration of its position with the time of day. In cases where the pattern shown would have been nowhere present under a blue sky at the given time of day, the bees danced disorientatedly.

(7) When transfered to an entirely different landscape, the bees sought their usual feeding ground for the most part in the correct direction. From this, too, it is evident that they utilize the sun's position as a compass and also take account of the time factor.

(8) Ants (*Lasius niger*) also possess the ability to orientate themselves according to the polarization of the light of the blue sky.

Brèves communications - Kurze Mitteilungen
Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschließlich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

L'oscillateur harmonique à n dimensions

Nous considérons un corpuscule de masse m se déplaçant dans un espace à n dimensions sous l'action d'une force attractive, proportionnelle au rayon vecteur et qui tend à le ramener vers l'origine des coordonnées.

Si w représente la fréquence mécanique de la théorie classique, la fonction potentielle V s'écrivant

$$(a) \qquad V = 2\pi^2 m w^2 \sum_i x_i^2 \quad (i = 1,2 \ldots n)$$

l'équation de propagation a la forme

$$(b) \qquad \Delta a + \frac{8\pi^2 m}{h^2}[E - 2\pi^2 m w^2 \sum_i x^2{}_i]a = 0.$$

Posons alors, avec M. Louis de Broglie[1]

$$(c) \qquad a(x_1, x_2, \ldots x_n) = \prod_i a_i(x_i)$$

l'équation (b) se décompose en n équations du type

$$(d) \qquad \frac{d^2 a_i}{dx_i^2} + \frac{8\pi^2 m}{h^2}[E_i - 2\pi^2 m w^2 x^2{}_i]\, a_i = 0$$

avec $E = \sum_i E_i$.

La notation $\lambda_i = \frac{2E_i}{hw}$ et le double changement de fonction et de variable

$$(e) \qquad a_i(q_i) = e^{-\frac{q_i^2}{2}} \cdot H_{ki}(q_i); \quad x_i = \frac{1}{2\pi}\left(\frac{mw}{h}\right)^{-1/2} q_i$$

transforme l'équation (d) en

$$(f) \qquad \frac{d^2 H_{ki}}{dq_i^2} - 2q_i \frac{d H_{ki}}{dq_i} + (\lambda_i - 1) H_{ki} = 0$$

où H_{ki} est le polynôme de Hermite de degré k.

Il devient alors aisé de passer au premier ordre

$$(g) \qquad \frac{d\tau_i}{dq_i} + \tau^2{}_i - 2q_i \tau_i + \lambda_i - 1 = 0;$$

tenant compte de la relation (c), nous avons

$$a = \exp.\left\{\sum_i \left(\int \tau_i \, dq_i - \tfrac{1}{2} q_i^2\right)\right\}$$

L'énergie E s'écrit

$$E = hw\left[\frac{n}{2} + \sum_i k_i\right]$$

ce qui montre que: pour un «oscillateur harmonique impair» (oscillateur à $2p+1$ dimensions), on obtient un énoncé de demi-quanta, alors que l'énoncé de quanta justifie «l'oscillateur harmonique pair» (oscillateur à $2p$ dimensions).

[1] Louis de Broglie, *Théorie de la quantification dans la nouvelle mécanique* (1932).

Nous pouvons associer à (g) la théorie, déjà classique, des développantes généralisées associées à une courbe plane. Nous trouvons une famille de courbes planes à paramétrisation isométrique dont la fonction d'arc a la valeur $\sigma'_i = \lambda_i - 1 = 2k_i$.

Il est intéressant de constater que les n solutions sont obtenues en donnant n valeurs à la constante k qui intervient dans $\lambda - 1 = 2k$.

Ainsi, on peut aborder une théorie oscillatoire, telle que celle de l'oscillateur harmonique à n dimensions, à partir de notions géométriques liées à une même équation de Riccati, la variation des niveaux d'énergie correspondant à une famille de courbes-planes (dont les plus simples sont des cercles) à paramétrisation isométrique.

Enfin, à partir de cette «chaîne de figures planes», on peut, posant

$$\tau_i - q_i = \frac{1}{V_i} \cdot \frac{\partial V_i}{\partial q_i},$$

passer aux «chaînes d'équations de Darboux»[1] le passage d'une forme, soit géométrique (cas des courbes isométriques), soit algébrique (cas des chaînes de Darboux), à la suivante se faisant suivant une loi connue.

M. Gabriel Viguier

Institut Henri Poincaré, Paris, le 30 novembre 1949.

Summary

We consider a particle having a mass m. It will be shown how it is possible to gain an oscillatory theory staring from classical metric notions connected with the same Riccati equation. Then we find the "Darboux chain" of the problem.

[1] G. Viguier, C.R. Acad. Sci. *224*, 14. 6. 48 No. 26.

Ein isoperimetrisches Problem mit Nebenbedingung

Durch Einführung von Nebenbedingungen wird das bekannte isoperimetrische Problem mit der Kugel als einziger Lösung in eigenartiger Weise modifiziert. So kann beispielsweise erzwungen werden, daß bei vorgegebener Oberfläche das absolute Minimum des Volumens nicht trivial ist und das Maximum des Volumens durch einen von der Kugel verschiedenen Körper geliefert wird. Aus diesem Grunde sowie wegen des Zusammenhangs mit einem ungelösten Problem der Theorie der konvexen Rotationskörper stelle ich folgendes Problem:

«Gesucht sind die konvexen Rotationskörper von der festen Länge l, welche bei vorgegebenem Volumen V die größte Oberfläche F aufweisen[1]*».*

[1] Vgl. hierzu die Dissertationen von G. Hormann (Göttingen 1887) und W. Howe (Berlin 1887). V und F dürfen ihre Rolle auch vertauschen.

Die Lösung lautet:

im Intervall $O \leqq V \leqq \frac{\pi l^3}{36}$ besitzen *Zylinder*,

im Intervall $\frac{\pi l^3}{36} < V < \frac{\pi l^3}{24}$ besitzen *Kegelstümpfe*,

im Intervall $\frac{\pi l^3}{24} \leqq V < \infty$ besitzen *Kegel*

die verlangte Eigenschaft. *Die Extremalkörper sind durch Vorgabe von V eindeutig bestimmt.*

Beweis. Bekanntlich bedeutet es keine Beschränkung der Allgemeinheit, wenn man nur konvexe Rotationskörper betrachtet, die aus lauter Kegelstümpfen aufgebaut sind. Die Meridiankurve jedes derartigen Körpers ist einfach ein Streckenzug, der durch Rotation um die X-Achse den Körper erzeugt. Wir teilen die Gesamtheit der Kegelstümpfe in zwei Klassen ein. In der Klasse I

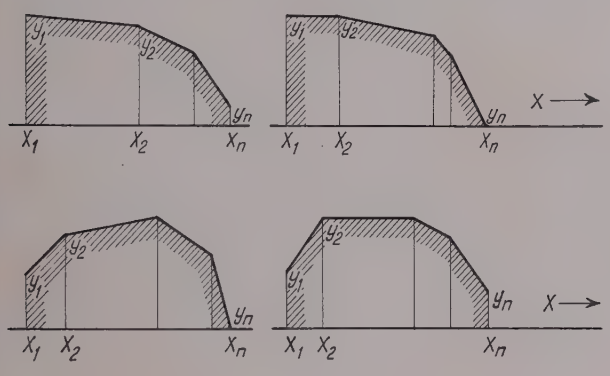


Abb. 1.

ist die Folge der Radien $y_1, y_2, \ldots y_n$, *monoton abnehmend* oder doch *monoton nicht zunehmend*. Bei Zugehörigkeit zur Klasse II fällt diese Beschränkung weg, und man hat nur die Konvexitätsbedingung zu beachten. Zunächst kann elementar gezeigt werden, daß kein Körper aus II bei festem Volumen größte Oberfläche besitzt[1]. Aus Platzersparnisgründen muß dieser Teilbeweis weggelassen werden.

Die Klasse I unterteilen wir weiter nach der Anzahl der Kegelstümpfe. Es ist nun durchaus natürlich, zuerst die Unterklasse I_1, also die Klasse der *eigentlichen Kegelstümpfe, Kegel und Zylinder* ins Auge zu fassen. In der Tat gelingt es leicht, die eingangs angeführten Resultate bei dieser Beschränkung zu gewinnen, namentlich wenn man neue Parameter einführt (Abb. 2).

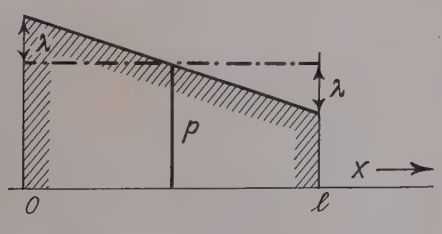


Abb. 2.

$$V = \frac{\pi l}{3}(3p^2 + \lambda^2)$$

$$F = 2\pi\,(p^2 + \lambda^2 + p\sqrt{l^2 + 4\lambda^2}) \qquad (1)$$

$$(O \leqq p < \infty;\ O \leqq |\lambda| \leqq p).$$

[1] Der Beweis führt über Doppelkegelstümpfe mit gleichen Endradien, Doppelkegelstümpfe mit verschiedenen Endradien zum allgemeinen Kegelstumpfkörper.

In einer (F, V)-Ebene lautet die Gleichung der Zylinderkurve $(\lambda = O)$:

$$l^2 F^2 - 4l \cdot FV + 4V^2 - 4\pi l^3 \cdot V = 0, \qquad (2)$$

die Gleichung der Kegelkurve $(|\lambda| = p)$

$$l^2 F^2 - 6l \cdot FV - 3\pi l^3 \cdot V = 0 \qquad (3)$$

oder aufgelöst

$$V = \frac{l \cdot F^2}{3(\pi l^2 + 2F)}. \qquad (4)$$

Setzt man (4) in (2) ein, so ist leicht ersichtlich, daß die beiden Kurven rechts vom Nullpunkt genau einen Schnittpunkt mit den Koordinaten

$$F^* = \pi l^2 \cdot \frac{\sqrt{3}}{4}; \qquad V^* = \pi l^3 \frac{(2-\sqrt{3})}{8} \qquad (5)$$

aufweisen. Ferner verläuft die Kegelkurve im Intervall $O < V < V^*$ oberhalb, im Intervall $V^* < V < \infty$ unterhalb der Zylinderkurve. Zwecks Gewinnung der Enveloppe der zweiparametrigen Kurvenschar (1) ist der Ausdruck

$$\frac{\partial V}{\partial p} \cdot \frac{\partial F}{\partial \lambda} - \frac{\partial V}{\partial \lambda} \cdot \frac{\partial F}{\partial p} \text{ zu diskutieren.} \qquad (6)$$

Die Nullstellen sind

(a) $\lambda = O$ (Zylinderkurve, geometrischer Ort von Kurvenenden).

(b) $p = \frac{\sqrt{l^2 + 4\lambda^2}}{6}$; $\lambda = \frac{1}{2}\sqrt{36p^2 - l^2}$ (7)

$$O \leqq |\lambda| \leqq p; \quad \frac{l}{6} \leqq p \leqq \frac{l}{4\sqrt{2}}. \qquad (8)$$

Mit Hilfe von (7) gewinnt man durch einsetzen und Elimination

$$V = \frac{l}{48}(6F - l^2\pi). \qquad (9)$$

und es stellt sich heraus, daß die Enveloppe das Stück der gemeinsamen Tangente von (2) und (3) zwischen den beiden Berührungspunkten

$$A\left(\frac{7\pi}{18} \cdot l^2, \frac{\pi}{36} \cdot l^3\right);\ B\left(\frac{\pi}{2} \cdot l^2, \frac{\pi}{24} \cdot l^3\right) \text{ ist}^1. \qquad (10)$$

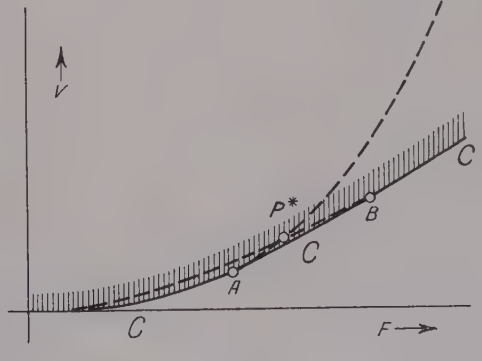


Abb. 3

[1] Der Kegelstumpf, dessen Bildpunkt senkrecht unter P^* auf der Enveloppe liegt, besitzt die Koordinaten

$$F^{**} = \pi l^2 \cdot \frac{\sqrt{3}}{4}; \quad V^{**} = \pi l^3 \frac{(3\sqrt{3}-2)}{96}.$$

Sein Volumen ist um ca. 0,6% kleiner als V^*!

(1) vermittelt eine Abbildung der (p, λ)-Ebene auf die (F, V)-Ebene. Einem bekannten Abbildungssatz gemäß[1] darf behauptet werden, daß die Abb. 1 keinen Bildpunkt liefert, der unterhalb des Kurvenzuges C liegt (Abb. 3).

Der Bildrand C, aus einem Parabelbogen, einer Strecke und einem Hyperbelbogen bestehend, ist als Ganzes *nach unten nicht konkav*. Dank dieses günstigen Umstandes ist es möglich, den Beweis zu Ende zu führen.

Einen beliebigen Doppelkegelstumpf aus I betten wir in eine einparametrige Schar von ebensolchen Körpern mit x als Parameter ein. Man berechnet (Abb. 4):

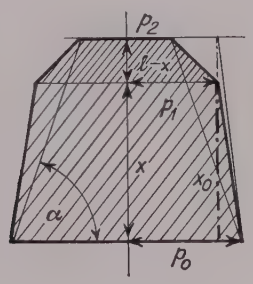


Abb. 4.

$$V = \frac{\pi x}{3}\left(p_0^2 + p_0 p_1 - p_1 p_2 - p_2^2\right) + \frac{\pi l}{3}\left(p_1^2 + p_1 p_2 + p_2^2\right) \qquad (11)$$

$$F = \pi\left[p_0^2 + p_2^2 + (p_0 + p_1)\sqrt{(p_0 - p_1)^2 + x^2} + (p_1 + p_2)\sqrt{(p_1 - p_2)^2 + (l-x)^2}\right] \qquad (12)$$

$$x_0 = \frac{l\,(p_0 - p_1)}{p_0}\,;\quad x_1 = l \qquad (13)$$

$$\frac{dV}{dF} = \frac{1}{3}\left(\frac{p_0^2 + p_0 p_1 - p_1 p_2 - p_2^2}{N(x)}\right) \qquad (14)$$

$$N(x) = \frac{(p_0+p_1)x}{\sqrt{(p_0-p_1)^2+x^2}} - \frac{(p_1+p_2)\,(l-x)}{\sqrt{(p_1-p_2)^2+\,(l-x)^2}} \qquad (15)$$

$$\frac{dN}{dx} = \left\{\frac{(p_0+p_1)\,(p_0-p_1)^2}{\left(\sqrt{(p_0-p_1)^2+x^2}\right)^3} + \frac{(p_1+p_2)\,(p_1-p_2)^2}{\left(\sqrt{(p_1-p_2)^2+(l-x)^2}\right)^3}\right\} > O \qquad (16)$$

Die betrachtete Kurve, mit einer positiven Steigung beginnend, ist also im ganzen Intervall $x_0 \leqq x \leqq x_1$ konkav nach unten. Da nun ihre Endpunkte als Bildpunkte von Kegelstümpfen *nicht unterhalb von C liegen*, so liegt der Bildpunkt des Doppelkegels als innerer Kurvenpunkt *sogar oberhalb von C*.

Die angewendete Deformation ist immer möglich und somit kann kein Doppelkegelstumpf extremal sein[2].

Der nächste Schritt besteht in der sinngemäßen Anwendung des Verfahrens auf den dreifachen Kegelstumpf, wobei der unterste Stumpf unangetastet bleibt. Genau wie oben kann festgestellt werden, daß auch in der Klasse I_3 kein Extremum möglich ist.

Das Verfahren ist aber von allgemeiner Tragweite. Wir approximieren irgendeinen Kegelstumpfkörper durch eine innere Folge von lauter Körpern aus I mit

$$F_1^{(i)} < F_2^{(i)} < F_3^{(i)} < \ldots < F;\quad V_1^{(i)} < V_2^{(i)} < \ldots < V$$

sowie durch eine äußere Folge von gleichartigen Körpern mit

$$F_1^{(a)} > F_2^{(a)} > \ldots\ldots > F;\quad V_1^{(a)} > V^{(a)}{}_2 > \ldots\ldots > V^*.$$

Beide Körperfolgen liefern Bildpunkte, die ganz oberhalb C liegen. *Wegen der Konkavität jeder Verbindungskurve muß dann der Bildpunkt des Ausgangskörpers oberhalb von C liegen.* Damit ist der Beweis fertig. Unsere Behauptungen lassen sich auch in Ungleichungen ausdrücken. Für konvexe Rotationskörper von der festen Länge l gilt folgendes System von Ungleichungen:

(1) $$V \geqslant \frac{l}{2}\left[(F + \pi l^2) - l\sqrt{2\pi F + \pi^2 l^2}\right];$$

$$O \leqq F \leqq \frac{7\pi}{18}\cdot l^2$$ Gleichheitszeichen nur für Zylinder

$$O \leqq p \leqq \frac{l}{6}$$

(2) $$V \geqslant \frac{l}{48}\,(6F - l^2\pi);$$

$$\frac{7\pi}{18}\cdot l^2 < F < \frac{\pi}{2}\cdot l^2$$ Gleichheitszeichen nur für Kegelstümpfe

$$\frac{l}{6} < p < \frac{l}{4\sqrt{2}}\,;\quad \lambda = \frac{1}{2}\sqrt{36p^2 - l^2}$$

(3) $$V \geqslant \frac{l \cdot F^2}{3\,(\pi l^2 + 2F)};$$

$$\frac{\pi}{2}\cdot l^2 \leqq F < \infty$$ Gleichheitszeichen nur für Kegel

$$\frac{l}{4\sqrt{2}} \leqq p < \infty.$$

Bern, den 15. Februar 1950. H. Bieri

Summary

The class of convex rotatory bodies with fixed length l is considered and it is shown that for

$O \leqq V \leqq \frac{\pi l^3}{36}$ *cylinders,*

$\frac{\pi l^3}{36} < V < \frac{\pi l^3}{24}$ *truncated cones,*

$\frac{\pi l^3}{24} \leqq V < \infty$ *cones*

with pre-determined volume possess the greatest surface. The demonstration is given with the aid of discussions of curves.

* Sind ∞-viele Schritte nötig, so liegt eine Schachtelfolge vor.

Das Raman-Spektrum des Azobenzols

Wir arbeiten seit einiger Zeit über die Erregung von Raman-Spektren durch die gelbe He-Linie 5875,6 A. Die zu überwindenden Schwierigkeiten waren: 1. die Konstruktion hochbelastbarer He-Lampen in einer lichtstarken Raman-Anordnung (Streuungsfaktor $\left(\frac{\nu_{(\mathrm{Hg}\,4358)}}{\nu_{(\mathrm{He}\,5876)}}\right)^4 = 3{,}3$); 2. die Erzielung eines sehr reinen Heliums, da sich infolge des hohen Ionisationspotentials des He schon schwache Verunreinigungen sehr störend bemerkbar machen; 3. die weitmöglichste Unterdrückung des Molekülspektrums des He_2, das in dem hier interessierenden Bereich einige störende Banden aufweist.

[1] H. Bieri, Diss. (Bern 1941).

[2] Der Zylinder natürlich bleibt von dieser Deformation unberührt.

Eine eingehende Beschreibung unserer Anordnung, die über den Rahmen einer kurzen Mitteilung herausgehen würde, wird bald an anderer Stelle erfolgen. Sie ermöglicht die Aufnahme von Raman-Spektren von photochemisch empfindlichen, fluoreszierenden und gelb- oder rotgefärbten Substanzen. Das unten mitgeteilte Spektrum des $C_6H_5N{=}NH_5C_6$ wurde aus einer 2,5%igen Lösung in CCl_4 in 20 Minuten erhalten, als Aufnahmematerial verwandten wir Kodak Tri-X Panchromatic Sheet Film.

Die vorliegende Mitteilung wurde veranlaßt durch unsere Kenntnisnahme eines Referats einer Arbeit von Yoshiya Kanda und Sunao Imanishi[1], deren Original uns leider bisher nicht zugänglich war. Die Autoren arbeiteten mit Erregung durch die gelben Quecksilberlinien 5770/5791 A und fanden drei Raman-Frequenzen des Azobenzols. Wir haben längere Zeit mit dieser Erregungsform gearbeitet, ohne befriedigende Ergebnisse zu erhalten; die Intensität der beiden gelben Hg-Linien ist nicht sehr hoch und ihre Absorption im Azobenzol ist beträchtlich, ebenso bewirkt die Reabsorption der Streustrahlung im Medium eine starke Schwächung zumindest der tieferen Frequenzen, die zahlreichen roten Hg-Linien stören und endlich leidet bei geringer Dispersion (die zitierten Autoren arbeiteten mit einer reziproken Dispersion von 160 A/mm) die Meßgenauigkeit durch das Vorhandensein zweier eng benachbarter erregender Frequenzen.

Es erscheint uns aus diesen Gründen interessant, ein vollständigeres und möglicherweise genaueres Raman-Spektrum des Azobenzols mitzuteilen, das wir durch He-Erregung erhielten. Wir fanden folgende Frequenzen:

$\Delta\nu$ cm^{-1}	I
265	2b
362	1
398	1
614	1b
870	0,5
1002	4
1152	10
1184	4
1400	3
1442	8
1487	4
1601	5b

Die Frequenz 1400 ist nicht ganz sicher, da sie nahezu mit dem Kopf der He_2-Bande 6398,7 A zusammenfällt, übrigens der einzigen störenden Linie in dem gesamten hier interessierenden Spektralbereich. Vergleichende Intensitätsmessungen machen jedoch diese Frequenz wahrscheinlich.

Die Aufnahmen wurden mit einem Lane-Wells-Spektrographen gemacht, der drei Prismen mit einer Gesamtbasis von 428 mm besitzt. Kollimator f = 920 mm, Öffnungsverhältnis 1:9,2; Kamera f = 345 mm, Öffnung 1:3. Die reziproke Dispersion beträgt im Bereich von 6000 A 63 A/mm. Wir arbeiteten mit einer Spaltbreite von 0,06 mm.

Leider beherrscht unser Spektrograph nur ein Gebiet bis herauf zu 7000 A, so daß wir die C–H-Valenzschwingungen nicht registrieren konnten. Kanda und Imanishi finden hier eine Frequenz von 2635 cm^{-1}, die schwer verständlich erscheint. In dem von uns untersuchten Bereich fanden sie zwei Frequenzen bei 1138 und 1433 cm^{-1}, die unsern beiden stärksten Frequenzen von 1152 und 1442 cm^{-1} ungefähr entsprechen. Sie ordnen die letztere der N=N Schwingung zu. Die restlichen Schwingungen wurden offenbar aus den oben mitgeteilten Gründen wegen ihrer geringeren Intensität nicht gefunden.

Zusammenfassend möchten wir vorläufig folgendes bemerken: Der größte Teil der aufgefundenen Frequenzen deuten sich unmittelbar als innere Schwingungen der am Molekül beteiligten beiden Benzolkerne. Das gilt insbesondere auch für die beiden Frequenzen 1152 cm^{-1} und 1184 cm^{-1}, die offenbar der aufgespaltenen zweifach degenerierten Grundfrequenz 1178 cm^{-1} des Benzols $\nu_{17}^{\mathbb{H}''}$ (e2g) nach der Zuordnung von Angus, Ingold und Leckie[1] entsprechen. Auffallend ist lediglich die hohe Intensität der Frequenz 1152 cm^{-1}, die die stärkste des gesamten Spektrums ist. Vielleicht hat dies die japanischen Autoren veranlaßt, sie – unserer Auffassung nach irrigerweise – der C-N-Schwingung zuzuordnen. Wir sehen eine gute Stütze unserer Auffassung in der Tatsache, daß zweikernige Moleküle ähnlicher Struktur und Symmetrie, wie Tolan und trans-Stilben, ebenfalls eine C-H-Deformationsschwingung von sehr hoher Intensität aufweisen. Die entsprechende Frequenz im cis-Stilben ist dagegen von «normaler» Intensität. Das führt uns zur Frage der cis-trans-Isomerie des Azobenzols. Die intensive Strahlung der zur Erregung verwendeten He-Lampe schafft zweifellos ähnliche Bedingungen wie in dem bekannten Versuch Hartleys[2], d. h. es findet wohl eine teilweise Umlagerung des normalen trans-Azobenzols in die cis-Form statt. Das Gleichgewicht dürfte auch hier bei etwa 20–25% der cis-Form liegen. Wir sind nun versucht, die starke Frequenz 1442 cm^{-1} der N=N-Schwingung der koplanaren trans-Form zuzuordnen, während die Frequenz 1487 cm^{-1} der entsprechenden Schwingung der cis-Form zukäme. In der letzteren sind die Ringe um 50° verdreht, der C–N-Abstand beträgt nach Robertson[3] hier 1,45 Å gegen 1,41 Å der trans-Form, bei der Resonanz zwischen verschiedenen Strukturen möglich ist. Der reine Doppelbindungscharakter der N=N-Bindung in der cis-Form macht die höhere Frequenz bzw. Kraftwert verständlich.

Die einzige bisher untersuchte Azoverbindung scheint das Azomethan zu sein; hier wird die Frequenz 1576 der N=N-Bindung zugeordnet[4]. Weder Kanda und Imanishi noch wir finden eine entsprechende Raman-Frequenz im Azobenzol, dagegen weist auch das Azomethan eine starke Linie bei 1442 auf. Wir hoffen, bald die Depolarisationsfaktoren der von uns gefundenen Schwingungen angeben zu können, um dann die Zuordnung mit größerer Sicherheit vorzunehmen.

H. Stammreich

Departamento de Física da Faculdade de Filosofia, Ciencias e Letras da Universidade de São Paulo, Brasilien, den 27. Dezember 1949.

Summary

(1) General features for obtention of Raman Spectra by excitation with the yellow He line were described.

(2) Twelve frequencies of the Raman spectrum of Azobenzene were measured, two of the found frequencies were described before by Kanda and Imanishi.

[1] Y. Kanda und S. Imanishi, J. Sci. Res. Inst. Tokyo *43*, 17 und 215 (1949). Ref. in Chem. Abstr. *43*, 8885 (1949).

[1] W. R. Angus, C. K. Ingold und A. H. Leckie, J. Chem. Soc. *1*, 925 (1936).

[2] G. S. Hartley, Nature *140*, 281 (1937).

[3] J. M. Robertson, J. Chem. Soc. 232 (1939). – J. J. Lange, J. M. Robertson und I. Woodward, Proc. Roy. Soc. A *171*, 398 (1939).

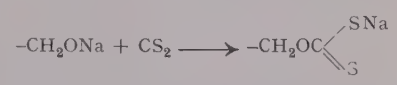
[4] Vgl. K. W. F. Kohlrausch, *Raman-Spektren* (Leipzig 1943), 293.

An Electron Microscopic Study of the Structure of Viscose Silk

In two previous publications[1] electron micrographs were shown of native cellulose as it is found in the cell walls of textile fibres, such as cotton, hemp and ramie, and of meristem cells as provided by the coleoptiles and roots of sprouting seeds. Viscose silk is formed from such cellulose fibres by solution and regeneration: this study has been made to see how their fine structure is altered by the chemical treatments leading to solution and to determine how much of the original structure is restored by the "regeneration" that takes place when the viscose is "regenerated" by spinning.

The large scale manufacture of viscose silk rests on a reaction worked out as long ago as 1893 by Cross, Bevan, and Beadle[2]. They found that carbon disulfide transforms alkali cellulose into a water soluble compound from which cellulose itself can be recovered through the action of acids. The essentials of this well-known process are the following:—

Highly purified cellulose, so-called artificial-silk cellulose, is first "mercerized" with 17% NaOH. The treated cellulose is pressed out, shredded and allowed to stand in the air. During this "ripening" an oxidative decomposition takes place. The resulting alkali cellulose is treated with carbon disulfide vapor with the formation of viscose as a yellow water soluble substance. This is an alkali xanthogenate which, according to Meyer and Mark[3], involves the following reaction:—



When spun into the acid bath, the xanthogenate group is split off again and cellulose regained in a more desirable physical form.

It seems obvious that the original fibrillar structure of the cellulose must have been altered by these repeated chemical disintegrations. The initial rough grinding in the pulp mill brings about extensive disorientation of the finer differentiated structure of the plant cell walls. During the following treatment with alkali there is a strong swelling which must disorient the molecular array within the individual fibrils. This desirable breakup facilitates a subsequent penetration and attack by the carbon disulfide vapor. There are today two points of view as to the fine structure thus produced within the xanthogenate solution. According to one of these the solution contains long fibrous molecules. The viscosity measurements of Staudinger and Reinecke[4] indicate for these molecules a mean degree of polymerization corresponding to *c.* 200–400 glucose residues; such particles should have a length of from 0·1 to 0·2 micra. Their small diameters, amounting to only one glucose residue, i.e. to *c.* 7·35 Å, would make them invisible in the electron microscope.

According to the other point of view, advanced by Lieser[5], these very thin molecules are associated together in packets in the "solution". Although they are not crystalline, the term "micelle" is often applied to these packets. Lieser could demonstrate chemically that many chains were only partially sulfided; and this becomes readily understandable if such molecular associations exist to impede penetration by the reagent. Unlike the individual molecular chains postulated by the first hypothesis, these associations should be visible in the electron microscope. During injection of the xanthogenate solution into the precipitating bath these larger associations should be more or less oriented and then fixed in place by the coagulating reagent; hence even after regeneration they should be discernible as structural elements within the finished viscose fibers.

[1] K. Mühlethaler, Biochim. biophys. acta *3*, 15 (1949); Biochim. biophys. acta (in press).

[2] C. F. Cross, E. T. Bevan, and C. Beadle, Ber. Dtsch. chem. Ges. *26*, 1090; 2520 (1893).

[3] K. H. Meyer and H. Mark, *Hochpolymere Chemie* (Leipzig 1940).

[4] H. Staudinger and F. Reinecke, Papierfabrikant *36*, 489 (1938).

[5] Th. Lieser, Liebigs Ann. Chem. *464*, 43 (1928); *470*, 104 (1929); *483*, 132 (1930).

Experimental

The fibers used in this investigation were samples taken from the routine production of a viscose factory. For electron microscopic examination they were shredded by 10 minutes treatment in a Waring blendor and the finest fraction from this treatment was mounted on the usual collodion-covered grids. Before study with an RCA-Type EMU electron microscope, such preparations were shadowed in the usual way with either chromium or palladium.

Results

Knowledge of the chemical reactions outlined above permits interpretation of what is seen in such preparations. Products of early steps in the process are still recognizable in finished fibers of artificial silk which therefore do not have a uniform internal texture. Even under the optical microscope and the ultramicroscope, particles are seen suspended in the otherwise structurless mass of viscose; and these have had the general appearance to be expected of undissolved remains of native cellulose fibers. The electron microscope demonstrates that these particles are far more numerous than optical observation had indicated. Such pieces of original cell wall spun into the finished viscose fiber are evident for example in Fig. 1. In the same way it is clear that the interlocking fibrillar network of Fig. 1 is a surviving bit of primary wall. Lignin, pectin and the other substances that accompanied cellulose in the original fibers seem to have been completely dissolved away with little alteration of the cellulose fibers themselves. Even the treatment with NaOH has not greatly changed them, for only the periphery of the fragment of Fig. 1 shows the effects of the chemical action. These residues of native cellulose have been seen with dimensions up to five micra, a limit doubtless set by the pore-size of the filters through which the material has been pressed.

Isolated cellulose fibrils are also found with the viscose fibers. These presumably were separated from their neighbors during the original milling. As Fig. 2 shows, they have been so grossly swelled by the alkali that they have not returned to their original dimensions on drying and evacuation. This makes it probable that the severe swelling has resulted in a break-up and disorientation of

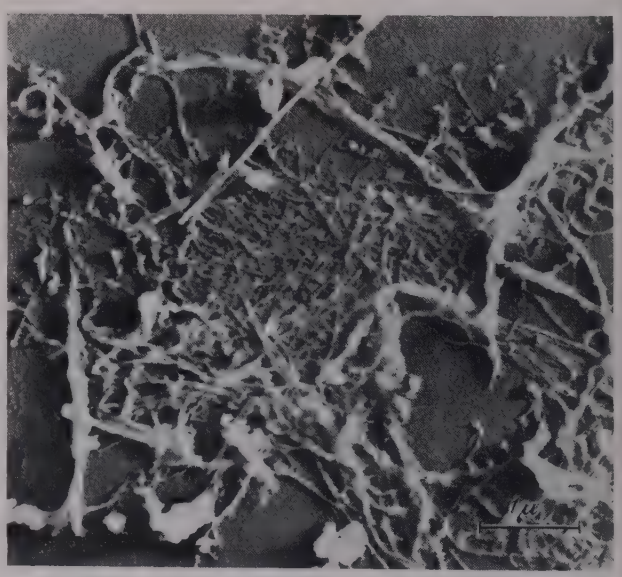


Fig. 1. – A partly disintegrated piece of primary cell wall from a viscose fiber. Magnification 13,000 ×.

Fig. 2. – Partly dissolved microfibrils. The strands have been greatly swelled by the treatment with NaOH. Magnification 12,000 ×.

the molecular elements. Such an intermediate stage is of interest in giving an indication of the way a fiber "dissolves"; through such a loosening of the molecular texture the solvent can penetrate better and the entire system must slowly disintegrate into its molecular components. These stages of breakdown are beautifully visible in the fibrils of Fig. 2. It might be expected that additional information about the internal structure of cellulose fibrils could be gained from these strongly swelled fibers. Their detailed study with this in mind gave slight and inconclusive evidence for the presence of fine-twisted threads, but was otherwise unrewarding.

The foregoing are structural elements of the original cellulose which have retained their initial form throughout the chemical treatment. Other detail seen within fibers of viscose silk can be recognized as material put into solution by the carbon disulfide. Figs. 3 and 4 show such material and emphasize the heterogeneity of the entire process of disintegration. Breakdown products no greater than, and therefore scarcely distinguishable from, the particles of the underlying collodion film are present along with many still intact pieces of fibril. The larger swelled shreds which stream in all directions from the original strands disperse gradually into discrete elements. Fig. 3 shows that this "dissolved" substance has a visible structure and must therefore consist of particles which are associations of numerous cellulose molecules.

Fig. 4 has been selected as typical of the artificial silk used in this investigation. It shows again the partially decomposed cellulose shreds interspersed with still further disintegrated fragments. Clearly these viscose fibers do not consist of completely dissolved and subsequently regenerated cellulose, but rather of such material serving as a cement and binder for undissolved components suspended in it. Fig. 5 shows a longitudinal section through a viscose fiber whose heterogeneous innerstructure is apparent only in its thin central strand. Elsewhere the surfaces are smooth because all holes and fractures have been filled in during extrusion into the precipitating bath. The big empty spaces visible in the picture probably have been produced by the action of the blendor. As TRILLAT and MATRICON[1] were able to show by diffusing air through viscose films, pores are present, but the present experiments do not throw light on their character.

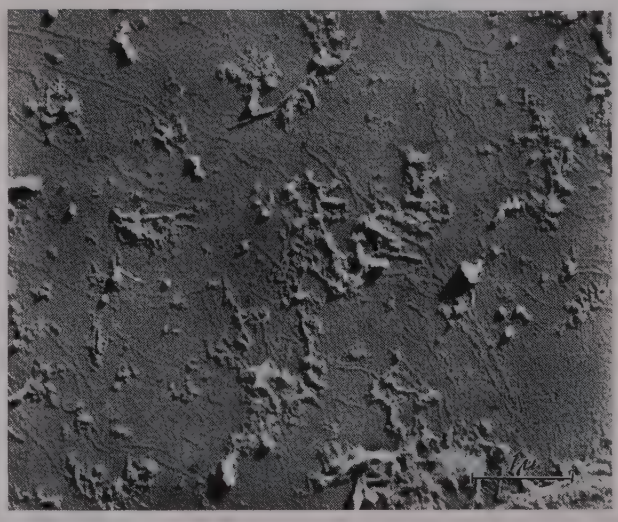


Fig. 4. – Residue of fine-grained undissolved material in a fiber of viscose silk. Magnification 13,000 ×.

Fig. 3. – Molecular components of cellulose xanthogenate seen in a viscose fiber, together with a few strongly swelled cellulose fibrils. Magnification 12,000 ×.

Discussion

From the foregoing results it is understandable that the tensile strength of the viscose fiber should be significantly less than that of native cellulose. The mean chain length is considerably shortened during the early "ripening" process and the later "solution"; and it is scarcely conceivable that fibers built up from an admixture of regenerated, short filaments and undissolved fragments should equal in strength the original cellulose.

The electron microscopic evidence that cellulose does not go into "solution" as individual molecules but as molecular groups and larger fragments agrees with the X ray observations of HESS and TROGUS[2] and of

[1] J. J. TRILLAT and M. MATRICON, J. chim. physique *32*, 101 (1935).

[2] K. HESS and C. TROGUS, Cellulosechemie *13*, 84 (1932).

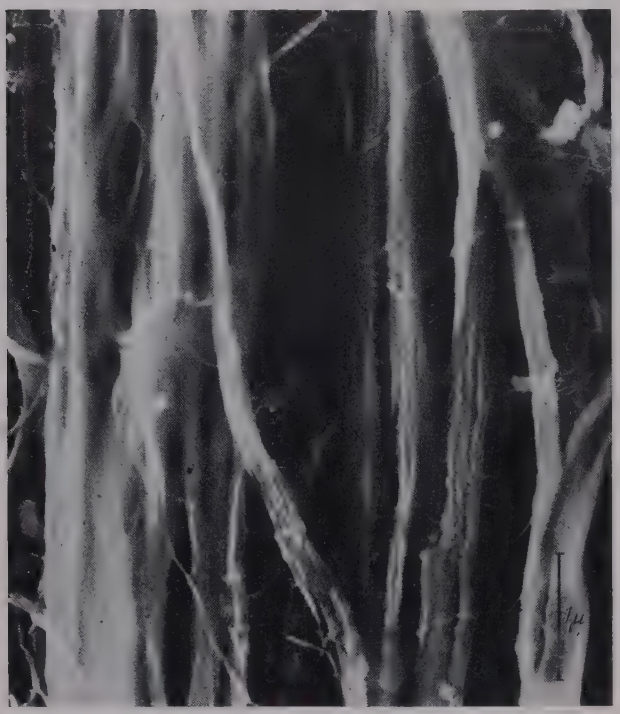


Fig. 5. – A section through a viscose fiber. Magnification 17,000 ×.

Schramek and Küttner[1], who found that the technical sulfided product always shows the diffraction lines of alkali cellulose.

It would be necessary to investigate artificial silk from other manufacturers before generalizing from the results of these experiments. There is reason to believe, however, that much the same structure would be found in other viscose fibers spun in the same way, though perhaps with different relative amounts of fragments and dissolved materials.

This work was carried out in the laboratory of Ralph W. G. Wyckoff, whom I wish to thank for many helpful discussions.

Kurt Mühlethaler[2]

Laboratory of Physical Biology, Experimental Biology and Medicine Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Md., October 31, 1949.

Zusammenfassung

Mit Hilfe des Elektronenmikroskops wurde die Feinstruktur einer Viskoseseide untersucht. Es zeigte sich, daß diese Fasern sehr heterogen zusammengesetzt sind. Wir fanden Teilchen mit typischer Zellwandstruktur und stark verquollene Fibrillen, welche in einer fein strukturierten Grundmasse, die als Auflösungsprodukt von Zellulosexanthogenat zu betrachten ist, eingebettet waren. Aus den Bildern geht hervor, daß die Zellulosemoleküle nicht einzeln, sondern gruppenweise in Lösung gehen. Beim Auspressen ins Fällbad werden diese Teilchen fixiert und bilden so den Kitt, um die übrigen Beimengungen miteinander zu verbinden. Alle Unebenheiten werden dadurch ausgefüllt, und die fertige Faser erscheint gleichmäßig glatt.

[1] W. Schramek and E. Küttner, Kolloid-Beih. *62*, 331 (1935).

[2] Special Fellow of the National Institutes of Health. Permanent Address: Pflanzenphysiologisches Institut der ETH., Zürich, Switzerland.

Die Elution von Fettfarbstoffen durch Albumin und Polyvinylpyrrolidon

Im Organismus des Warmblüters finden ständig Austauschreaktionen statt zwischen Blutstrom und den angrenzenden Geweben; bald sind es Vitamine und Hormone, die durch Adsorption und Diffusion in das Gewebe übertreten, bald sind es Abbauprodukte, Pigmente und Toxine, welche das Blut durch Elution aus den Geweben herauslöst. Nachdem die Elution in erster Linie von den Proteinen des Blutserums bewirkt wird, welche anschließend im Sinne Bennholds[1] den Transport zum Ausscheidungsorgan übernehmen, haben wir ein Modell[2] entwickelt, an welchem die eluierende Fähigkeit von Serumproteinen und von Plasmaersatzmitteln geprüft werden kann. Neuerdings können an der solchermaßen standardisierten Elution neben den hydrophilen Eigenschaften der Proteine auch deren lipophile Eigenschaften in meßtechnisch einfacher Weise bestimmt werden. Dazu werden aus Hautfasermembran tierischer Abkunft (nicht Cellophan, dessen Anfärbung ungenügend wasserecht ist) Scheibchen gestanzt von 9 cm Durchmesser. Entsprechende Membranen sind bei Firmen des Fleischwarengroßhandels leicht erhältlich. Es ist zweckmäßig, die Hautfasermembranen in der feuchten Atmosphäre eines Eisschrankes aufzubewahren. Die Membranscheibchen werden alsbald in Petrischalen gelegt von 9,5 cm Durchmesser und mit den folgenden Lösungen, deren Volumen stets 30 cm^3 beträgt, allseitig überspült. Vorerst werden die Fettfarbstoffe zwecks Reinigung zweimal aus Wasser/Alkohol-Gemischen umgefällt; darauf stellt man Stammlösungen her von 100 mg% Sudanrot I (Grübler, Leipzig), Sudanschwarz B (Hollborn, Leipzig) und Blau BZL (Ciba, Basel) in Alkohol 96% (vgl. L. Lison[3] und B. Romeis[4]). Von der Stammlösung des Sudanrot I wird 1 cm^3 zu 13 cm^3 Alkohol 96% und 16 cm^3 H_2O zugefügt; mit den übrigen Fettfarbstoffen wird analog verfahren. In diesen Farblösungen verbleiben die Fasermembranen (je eine auf 30 cm^3 Farbstofflösung) für 24 Stunden (Zimmertemperatur). Darauf werden die Membranen mit der Pinzette umgedreht und weitere 72 Stunden in der Lösung belassen. Nach total 96 Stunden läßt sich aus dem Farbstoffschwund kolorimetrisch ermitteln (Korr. f. Verdunstung), daß von den Membranen 650–700 γ Sudanrot, 350–400 γ Sudanschwarz und 900–950 γ Blau BZL aufgenommen wurden. Die Membranen werden alsbald mit Wasser kräftig abgespült und sind für die Elutionsversuche bereit. Um das Ergebnis genau quantitativ zu gestalten, schreibt man von jeder Membran ihren Farbstoffgehalt auf. Für den Vergleich der Elution hydrophiler Azofarbstoffe (siehe Wunderly[2]) werden von Evans-Blue (British Drug House, London), Benzoblau, Trypanblau und Victoriablau (alle Grübler, Leipzig) soviel in je 30 cm^3 H_2O gelöst, daß die Konzentration mol/100000 beträgt. Nach 48 Stunden sind die Farbstoffe quantitativ auf die Fasermembran gezogen; es wird kräftig mit H_2O abgespült und die noch feuchten Membranen in 30 cm^3 der Elutionsflüssigkeit eingetaucht (Petrischalen, bedeckt). Diese Elutionsflüssigkeit enthält für alle Farbstoffe gleichermaßen 0,166 g% Albumin, von dem salzarmen Albuminkonzentrat, das die Cutter Laboratories (USA.) für Injektionszwecke herausbringen. Die Reinheit des Präparates wurde von uns elektrophoretisch geprüft

[1] H. Bennhold, H. Ott und M. Wiech, Dtsch. med. Wschr. *75*, 11 (1950).

[2] Ch. Wunderly, Ärztl. Forschg *4*, I/29 (1950).

[3] L. Lison, Histochimie animale (Paris 1936).

[4] B. Romeis, Mikroskopische Technik (München 1948).

(Abbildung des Diagramms in WUNDERLY und WUHRMANN[1]); ferner die UV-Absorption identisch gefunden mit jener von kristallisiertem Rinderalbumin (Armour & Co., Chicago). Nach E. COHN und Mitarbeiter[2] enthält Reinalbumin höchstens 0,04% Cholesterin, ein Gehalt, der zu gering ist, um meßbare lipophile Wirkungen hervorzubringen.

Die Hautfasermembranen werden für 48 Stunden bei Zimmertemperatur im wasserklaren Albuminsol belassen; darauf wird der Farbstoffgehalt der Elutionsflüssigkeit in 1-cm³-Küvetten des Stufenphotometers von Zeiß bestimmt. Als Vergleichslösung dient eine 0,166%-Albuminlösung. Für die blauen Farbstoffe wird Filter S_{61} verwendet, für Sudanrot S_{50}.

Tabelle I

Farbstoff	γ Farbstoff an der Membran	Elution nach 48 Std.	
		in % des gesamten Farbstoffes	γ Farbstoff pro mg Albumin
Fettfarbstoffe:			
Blau B.Z.L.	920	1,10	0,20
Sudanschwarz B	360	0,58	0,04
Sudanrot I	700	3,41	0,47
Wasserlösliche Farbstoffe:			
Evans-Blue, sauer	285	57	3,2
Benzoblau, sauer	272	27	1,5
Trypanblau, sauer	285	15	0,8
Victoriablau, basisch	136	8	0,2

Die Zahlen der letzten Kolonne geben eine Vergleichsmöglichkeit der lipophilen und der hydrophilen Eigenschaften von Reinalbumin. Wir sind gegenwärtig damit beschäftigt, diese Charakterisierung mit Patientensera durchzuführen, wo die lipoidtragenden Unterfraktionen der α- und β-Globuline pathologisch vermehrt sind.

Untenstehend ist das Ergebnis der Prüfung der eluierenden Wirksamkeit einer Konzentrationsreihe von Albumin. Vergleichshalber wurden gehaltgleiche Lösungen von «Subtosan» mitgemessen. «Subtosan» ist ein französisches Plasmaersatzmittel, dem ähnlich wie bei «Periston» das hydrophile, kolloide Polyvinylpyrrolidon (zyklisches Säureamid) als Basis dient. Der mittlere Farbstoffgehalt der Membran war 660 γ Sudanrot I.

Tabelle II

Elutionsmittel in 30cm³ NaCl phys. gelöst		Elution bei 18° C	
		nach 48 Stdn.	nach 120 Stdn.
		γ Sudanrot pro mg Elutionsmittel	
200 mg	Albumin	0,24	0,37
	Subtosan		0,09
400 mg	Albumin	0,17	0,25
	Subtosan		0,08
600 mg	Albumin	0,13	0,19
	Subtosan		0,08
800 mg	Albumin	0,11	0,16
	Subtosan		0,07

[1] CH. WUNDERLY und F. WUHRMANN, Brit. J. Exp. Path. *28*, 286 (1947).

[2] E. COHN *et al.*, J. Amer. Chem. Soc. *68*, 459 (1946).

Mithin ist die eluierende Wirkung der verdünnten Lösungen von Albumin größer als die der gehaltreichen. Demgegenüber bleiben die lipophilen Eigenschaften von «Subtosan» stark zurück, was für seine klinische Verwendungsmöglichkeit nicht ohne Bedeutung ist.

CH. WUNDERLY

Medizinische Universitätsklinik Zürich, den 10. Februar 1950.

Summary

In order to gain a model for the standard elution of the fat-dyes: Sudanred, Sudanblack, and Blue BZL, the latter are adsorbed on membranes of fibrous tissue. The following elution of the adsorbed fat-dyes by Albumin (human), as well as the french plasma Substitute "Subtosan", are followed colorimetrically. The results are compared with the elution of the hydrophile dyes: Evans-Blue, Benzoblue, Trypanblue, and Victoriablue. Such a comparison shows, that the elution of hydrophilic dyes by albumin is appreciably stronger than the elution of lipophilic dyes. The elution of Sudanred by Albumin is between 2 and 4 times stronger than by Subtosan.

Study of Some Constituents of Vitamin B_{12}

Through the kindness of Prof. T. REICHSTEIN and Dr. O. SCHINDLER of the University of Basle, who placed several specimens of crystalline vitamin B_{12} (prepared by them from liver) at our disposal, we were able to carry out a number of orienting experiments on the composition of this compound. Filter paper chromatography was employed in all experiments in the course of which a total of about 10 mg of the vitamin was used.

In view of the rather obscure relationship between vitamin B_{12} and the desoxyribose nucleosides[1] it appeared of interest to search for the presence of pyrimidines and of other nucleic acid constituents, such as desoxypentose, in hydrolysates of the vitamin. Several hydrolysis experiments were carried out in which the compound was degraded with concentrated formic acid (2 hours at 175° in a bomb tube), i. e. under conditions that bring about the complete cleavage of nucleic acids to free purines and pyrimidines[2]. The hydrolysates were examined chromatographically with some of the solvent systems (*n*-butanol-water, *n*-butanol-diethylene glycol-water with and without NH_3) that are normally used for the separation of purines and pyrimidines[3]. Test mixtures of the purines and pyrimidines were run alongside. Neither thymine nor any other pyrimidine or purine could be detected nor, for that matter, any compound giving the characteristic absorption shadow on the paper chromatogram in the ultraviolet light of the "Mineralight" lamp (Ultraviolet Products Corp., Los Angeles, Cali-

[1] W. SHIVE, J. M. RAVEL, and R. E. EAKIN, J. Amer. Chem. Soc. *70*, 2614 (1948). – L. D. WRIGHT, H. R. SKEGGS, and J. W. HUFF, J. Biol. Chem. *175*, 475 (1948). – W. SHIVE, J. M. RAVEL, and W. M. HARDING, J. Biol. Chem. *176*, 991 (1948). – C. E. HOFFMANN, E. L. R. STOKSTAD, A. L. FRANKLIN, and T. H. JUKES, J. Biol. Chem. *176*, 1465 (1948). – V. KOCHER and O. SCHINDLER, Intern. Z. Vitaminforsch. *20*, 441 (1949). – E. KITAY, W. S. MCNUTT, and E. E. SNELL, J. Biol. Chem. *177*, 993 (1949). – R. M. TOMARELLI, R. F. NORRIS, and P. GYÖRGY, J. Biol. Chem. *179*, 485 (1949).

[2] E. VISCHER and E. CHARGAFF, J. Biol. Chem. *176*, 715 (1948). – E. CHARGAFF, E. VISCHER, R. DONIGER, C. GREEN, and F. MISANI, J. Biol. Chem. *177*, 405 (1949).

[3] E. VISCHER and E. CHARGAFF, J. Biol. Chem. *176*, 703 (1948).

fornia)[1]. It should be mentioned that the inspection of chromatograms of such formic acid hydrolysates (irrigated with *n*-butanol-water) in ultraviolet light revealed the presence of two (and sometimes three) fluorescing zones of which the slower exhibited a yellowish, the faster a light-bluish fluorescence. Eluates with 0·1 N HCl showed, however, no characteristic absorption in the ultraviolet, but only a continuous increase in extinction towards the shorter wavelengths. These zones probably represent degradation products of the substituted benzimidazoles previously isolated from vitamin B_{12}[2].

The search for the presence of a desoxypentose made use of the procedure originally elaborated for the release of desoxyribose from desoxyribonucleic acids, which is based on the enzymatic digestion of the substance to the nucleoside stage by means of an *Aspergillus* enzyme preparation "mylase P" (Wallerstein Laboratories, New York), followed by a brief hydrolysis at p_H 1·5[3]. There were no indications that during a hydrolytic cleavage of this kind the liberation of a sugar took place.

In another type of chromatographic experiment the action of resting cells of *E. coli* on solutions of the vitamin (4 hours at 36° in 0·1 M phosphate buffer of p_H 6·9) was examined[4]. Here, too, no release of purines, pyrimidines or their derivatives was observed.

Several hydrolysates of the vitamin at 100° (N HCl for 30 minutes and one hour, 2 N HCl for two hours, N HPO_3 for 30 minutes) were examined for the presence of reducing sugars capable of yielding adsorption zones fluorescing in ultraviolet light following condensation with *m*-phenylenediamine[5]. The hydrolysates were chromatographed in aqueous butanol-pyridine, butanol-diethylene glycol, and isobutyric acid[6]. Although faintly fluorescent zones were observed in several instances, no clear evidence of the presence of a reducing sugar was obtained.

Finally, the amino compound giving the ninhydrin reaction[7] was investigated with the use of the quantitative micro-procedures recently developed in this laboratory in connection with studies of lipid composition[8]. Whereas tests for the occurrence of a compound of the type of choline, yielding an insoluble phosphomolybdate, were negative, no difficulty was experienced, in contrast to a statement in the literature[9], in demonstrating the presence in the chromatograms of the vitamin hydrolysates of one fraction reacting with ninhydrin to give a purple spot. In descending unidimensional paper chromatograms this component had a R_F value of 0·45 (as compared with 0·35 for ethanolamine) in *n*-butanol-diethylene glycol-water (4:1:1). When the upper layer of a mixture of 4 volumes of *n*-butanol, 1 volume of glacial acetic acid and 1 volume of water was employed as the solvent system, the R_F value of this component was 0·44 (ethanolamine 0·33). In agreement with the findings of Ellis *et al.*[1] it is felt that this compound could be 2-amino-1-propanol. As chromatographic and analytical reference substance *dl*-2-amino-1-propanol, prepared by the reduction of *dl*-alanine ethyl ester with lithium aluminum hydride[2], was employed; but no statement can, of course, as yet be made regarding the optical configuration of the natural product. The quantitative determinations were performed by an adaptation of the method originally developed for ethanolamine[3]. The vitamin B_{12} crystals lost 10·5% of their weight (2 determinations gave 10·53, 10·55%), when dried for 2 hours at 61° over P_2O_5 in a high vacuum. The analyses reported here are based on the weight of the dry compound.

The most consistent results were obtained when the vitamin was hydrolyzed with 6 N HCl for 6 hours in a sealed tube at 100°. In two independently prepared hydrolysates, each analyzed several times, 13·3 and 13·5% of 2-aminopropanol were found. On the basis of a content of 2·65% P in the dried crystals of the vitamin[4] this corresponds to a molar ratio of aminopropanol to phosphorus of 2.

With a milder hydrolysis at 100° (1 hour in N HCl or 2 hours in 2 N HCl) the release of amino alcohol appeared incomplete; the corresponding molar ratio was about 1·4. A more energetic treatment (6 N HCl for 2 hours at 175° in a bomb tube) gave inconsistent results.

It should be pointed out that no definite claim as to the identification of the amino compound responsible for the ninhydrin reaction can be made on the basis of the experiments reported here. To give one out of possibly several examples: One other aminopropanol tested by us, namely 1-amino-2-propanol, occupies a position on the chromatograms that is indistinguishable from that of its isomer. The color values of the reaction products of these two amino alcohols with ninhydrin are practically identical. The molar ratio with respect to phosphorus would, therefore, remain the same, regardless of which of these isomeric aminopropanols occurs in the vitamin.

The acid hydrolysis of vitamin B_{12} has been reported to give rise to the formation of ammonia[1]. It was known from previous experience with other compounds that under the conditions of the chromatographic experiments the bulk, if not all, of the ammonia assembled in the ethanolamine region (R_F about 0·30 in butanol-diethylene glycol-water), forming a diffuse colored zone on the ninhydrin-treated papers. It was possible to exclude the possibility that this diffuse adsorption zone contained ethanolamine. Eluates of segments of this zone were, consequently, assayed photometrically after reaction with ninhydrin[5] and the results read against ammonia standards. With 6 N HCl (6 hours at 100° in a

[1] E. Chargaff, B. Magasanik, R. Doniger, and E. Vischer, J. Amer. Chem. Soc. *71*, 1513 (1949).

[2] N. G. Brink and K. Folkers, J. Amer. Chem. Soc. *71*, 2951 (1949). – G. R. Beaven, E. R. Holiday, E. A. Johnson, B. Ellis, P. Mamalis, V. Petrow, and B. Sturgeon, J. Pharm. Pharmacol, *1*, 957 (1949).

[3] E. Chargaff, E. Vischer, R. Doniger, C. Green, and F. Misani, J. Biol. Chem. *177*, 405 (1949). – E. Vischer, S. Zamenhof, and E. Chargaff, J. Biol. Chem. *177*, 429 (1949).

[4] E. Chargaff and J. Kream, J. Biol. Chem. *175*, 993 (1948).

[5] E. Chargaff, C. Levine, and C. Green, J. Biol. Chem. *175*, 67 (1948).

[6] S. M. Partridge, Biochem. J. *42*, 238 (1948).

[7] B. Ellis, V. Petrow, and G. F. Snook, J. Pharm. Pharmacol. *1*, 60, 950 (1949).

[8] E. Chargaff, C. Levine, and C. Green, J. Biol. Chem. *175*, 67 (1948). – C. Levine and E. Chargaff, Federation Proc. *8*, 219 (1949); and unpublished results.

[9] N. G. Brink, D. E. Wolf, E. Kaczka, E. L. Rickes, F. R. Koniuszy, T. R. Wood, and K. Folkers, J. Amer. Chem. Soc. *71*, 1854 (1949).

[1] B. Ellis, V. Petrow, and G. F. Snook, J. Pharm. Pharmacol. *1*, 950 (1949).

[2] P. Karrer, P. Portmann, and M. Suter, Helv. chim. acta *31*, 1617 (1948).

[3] C. Levine and E. Chargaff, Federation Proc. *8*, 219 (1949); and unpublished results.

[4] Private communication from Prof. T. Reichstein.

[5] S. Moore and W. H. Stein, J. Biol. Chem. *176*, 367 (1948).

sealed tube) 6% of ammonia were found; with milder hydrolysis methods the amounts of NH_3 varied from 2·6 to 3·8%.

This work has been supported by a grant from the *Life Insurance Medical Research Fund.*

Erwin Chargaff, Celia Levine, Charlotte Green, and Jacob Kream

Department of Biochemistry, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York 32, N. Y., February 28, 1950.

Zusammenfassung

Es wird über eine Reihe von Studien berichtet, welche die Zusammensetzung des Vitamins B_{12} zum Gegenstand haben. Diese mit sehr kleinen Substanzmengen ausgeführten Versuche bedienten sich ausschließlich der Chromatographie auf Filtrierpapier. Zwei Probleme bildeten den Hauptgegenstand der Untersuchung, nämlich die Frage des Vorkommens von Nukleinsäurebestandteilen im Vitamin und die quantitative Bestimmung der schon früher nachgewiesenen Aminoverbindung. In der für Nukleinsäuren ausgearbeiteten Versuchsanordnung konnten weder Purine, noch Pyrimidine oder Desoxyribose nachgewiesen werden. Die Bestimmung der Aminoverbindung ergab das Vorliegen von 2 Molen Aminoderivat (berechnet als 2-Amino-1-propanol) pro Mol Phosphor.

Studies on the Possibility of Using Protamin Sulfate in the Technique of *in vitro* Cultures of Hematopoietic Tissues

The use of heparin (Craciun[1]) has rendered easier the technique of the culture of tissues, because it allows of obtaining a fluid plasma—with unaltered physical and chemical conditions—to be used as a cultural medium. At the appropriate moment this heparinized fluid plasma is then coagulated by the addition of embryonic extract.

In order to simplify this second phase of the cultural technique, which depends on embryonic extracts of recent preparation (these extracts lose their activity in 1–2 days), we have thought useful to investigate whether the part played by these extracts could be taken over by some stuff easy to store, and consequently always at the disposal of the scientist. Such a stuff would be desirable especially for cultures of leucocytes and hematopoietic tissues in general, which themselves secrete trephonic substances into the medium.

As a means for coagulating heparinized plasma we have chosen to study the proprieties of protamin sulfate, whose ability to neutralize heparin had been shown by Chargaff and Olson[2]. On the one hand we investigated not entirely clear some aspects of the interference of protamin sulfate with heparinized plasma, and on the other hand the behaviour of the various functional activities of bone marrow cultures in heparinized plasma coagulated with protamin sulfate instead of embryonic extracts. In this paper we summarize some of the results that concern the first of the two aspects of this question.

First we set out to find the amount of protamin sulfate (Protamin 3711/2 Roche) necessary to coagulate *in vitro* human plasma of healthy subjects fasting since 12 hours, this plasma having been obtained and kept fluid by the addition of 10 AU (anticoagulant units) of heparin (Liquemin Roche) per cc. of blood. At the same time we determined the time necessary for clotting when the amounts of protamin varied in relation to the optimal amount. We have chosen 10 AU of heparin per cc. of blood, because this is the dose which we generally use for the preparation of the cultural medium in our studies of cultures of hematopoietic tissues. We have been able to establish the following points:—

(1) With amounts of protamin less than 0·001 mg no clotting takes place—at least within the 48 hours we prolonged our observation.

(2) At 37° C coagulation begins with a dose of 0·001–0·005 mg of protamin, and can be obtained with all the intermediate amounts up to the extreme one of 3 mg.

(3) With an amount of protamin greater than 3 mg, the plasma does not coagulate any more, at least within 48 hours.

(4) The optimal amounts of protamin by which the fluid plasma is coagulated within 15′ extend from 0·03–0·6 mg; those by which the clotting is obtained within 30′ range between 0·02 mg and 1 mg.

(5) When the amounts of protamin depart from the optimal ones—increasingly or decreasingly—the clotting time is obviously increased. For instance, our minimal coagulating amount of protamin has been 0·001 mg with a coagulation time of 115′: the maximal coagulating amount of protamin has been 3 mg, and coagulation time was 840′.

The second point we wanted to investigate was the influence of temperature on the clotting time *in vitro* of human heparinized plasma under the effect of protamin. We have been able to note that:

(1) The optimal temperature for clotting to happen lies between 33°–37° C.

(2) At room temperature the clotting time is twice or three times as great as at optimal temperature.

(3) The influence of temperature on coagulation becomes more marked when amounts under and over the optimal protamin quantities are used.

As a third aspect of the problem we wanted to investigate whether protamin is active only on recently prepared plasma, or whether it is able to coagulate also fluid plasma stored at room temperature. We established that upon addition of optimal doses of protamin the clotting time increases (up to 2–3 times the initial one) up to complete absence of clotting on the 3rd–5th day. For the plasma stored in ice-box we have been able to note the persistence of the coagulability till 9th day.

Experiments made with heparinized plasma of guinea pig and rabbit fasting since 18 hours showed that the optimal protamin amounts and coagulation times for the plasma of these animals correspond to the values established for human plasma.

At last we tried to assembly some data in order to explain the fact that protamin is able to clot plasma obtained and preserved fluid by heparin addition, although it is itself an anticoagulant (Thompson[1], Waldschmidt-Leitz and coworkers, 1929). We have therefore repeated the titration between heparin and protamin (Chargaff[2]), by titrating 5 cc. of a heparin solution containing 1,000 AU/cc. with a 1:1,000 protamin

[1] E. Craciun, Arch. exp. Zellforschg. *2*, 295 (1925/26).
[2] E. Chargaff and K. B. Olson, J. Biol. Chem. *122*, 153 (1937/38).

[1] W. H. Thompson, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. *29*, 1 (1900).
[2] E. Chargaff, J. Biol. Chem. *25*, 671 (1938).

solution. A slight milkish opalescence was to be seen with a protamin amount of 0·5 mg. This opalescent liquid precipitated after centrifugation into a whitish crystalline sediment, which could be suspended by stirring in water or plasma. If this substance is the result of the reaction between protamin and heparin, it is easy to understand that the plasma liberated from heparin by the addition of an appropriate amount of protamin undergoes the normal coagulation phases.

At the end of this short report we conclude that protamin sulfate offers sufficiently favourable characteristics as a coagulation means for the nutritional medium, and consequently its use appears justified for the *in vitro* cultures of hematopoietic tissues. We have therefore initiated experiments in order to establish whether such procedure does not interfere with the normal behaviour of the functional activities of the explanted cells.

Giovanni Astaldi and Jenny Franko

Department of Internal Medicine, University of Pavia, December 1, 1949.

Zusammenfassung

Die Autoren haben sich die Aufgabe gestellt, eine Substanz zu suchen, die an Stelle der embryonalen Extrakte den zur Kultur von hämatopoietischem Gewebe nötigen Nährboden koagulieren kann. Zu diesem Zwecke haben sie die Fähigkeit des Protaminsulfats, menschliches, heparinisiertes Plasma zu koagulieren, untersucht. Hierbei wurde festgestellt, welches die optimalen Konzentrationen und die Grenzmengen des Protaminsulfats sind, die zur Gerinnung des Plasmas führen. Ferner wurde die Gerinnungszeit bei verschiedenen Protaminmengen, der Einfluß der Temperatur auf die Koagulationsgeschwindigkeit sowie die Zeitspanne, in der die Zugabe von Protamin jedoch noch imstande ist, heparinisiertes Plasma zur Gerinnung zu bringen, bestimmt.

Zytochemischer Nachweis der Adenosintriphosphatase (ATP-ase) in den Zellen des Asictestumors der Maus

Während einer Untersuchung über den Ribonucleinsäuregehalt (RNS) der Zellen des Ascitestumors der Maus ergaben Versuche mit der Gomori-Reaktion, daß die Zellen keine alkalische Phosphatase enthielten. An bestimmten epithelialen Tumoren kamen Kabat und Furth[1] und Manheimer und Seligman[2] zu gleichen Befunden. Da sich unser Testobjekt frei von alkalischer Phosphatase zeigte, wurde es für die Untersuchung auf ATP-ase gewählt, nachdem Herr Prof. Lettré mich anregte, das Enzym zytochemisch nachzuweisen.

Methode. Der Ascitestumor der Maus ist eine Abart des Ehrlichschen Mäusekarzinoms und entsteht durch intraperitoneales Verimpfen der Zellen[3]. Es bildet sich dabei ein Transsudat in der Bauchhöhle, in dem sich die Zellen frei beweglich vermehren. Durch Punktion der Ascitesflüssigkeit läßt sich Tumormaterial gewinnen. Die Lebenszeit der Tiere beträgt infolge des starken Ascites etwa 15 Tage.

Von ungefähr 50 weißen Mäusen mit Ascitestumoren verschiedenen Alters wurden pro Tier 8–10 Ausstriche angefertigt und bei Zimmertemperatur luftgetrocknet. Die Hälfte der Präparate diente als Kontrolle.

ATP-ase wurde mit der von Glick[1] modifizierten Gomori-Reaktion nachgewiesen. Zu jedem Versuch lief als Kontrolle die Gomori-Reaktion[2] auf alkalische Phosphatase. Als Substrate dienten Na-Glycerophosphat und Adenosintriphosphorsäure (ATP)[3]. Die Versuchslösung zum Nachweis der alkalischen Phosphatase hatte einen p_H-Wert von 9,4 und die für ATP-ase einen p_H-Wert von 9,0. Als Puffer wurde Veronal-Na benutzt. Die günstigste Bebrütungszeit betrug 5 Stunden. Die Reaktion auf alkalische Phosphatase blieb auch nach 24stündiger Inkubation negativ. In den Kontrollausstrichen wurden die organischen Phosphatlösungen durch destilliertes Wasser ersetzt. Bei einem Teil der Präparate kam als Gegenfärbung die Feulgen-Nukleal-Reaktion zur Anwendung.

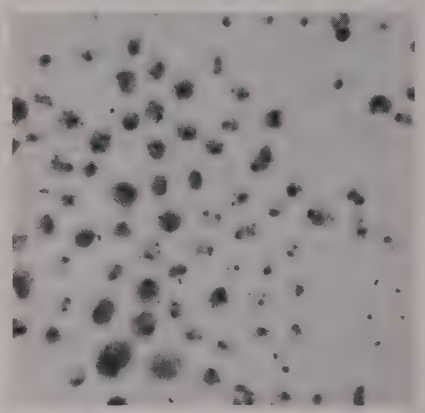


Abb. 1. Gomori-Reaktion auf ATP-ase. Mikrophotographie, Vergr. etwa 1000mal.

Resultate. Die stärkste ATP-ase-Reaktion gaben die Nucleoli der Tumorzellen (Abb. 1). Die Stärke der Schwärzung nahm in der Reihenfolge Nukleolus, Nucleus, Zytoplasma ab. Wie die Aufnahme zeigt, war letzteres in manchen Zellen negativ. Daß die Orte der ausgeprägtesten Schwärzung in den Zellen den Nucleolen entsprachen, konnte durch Beobachtungen mit dem Phasenkontrastmikroskop erhärtet werden.

Im Gegensatz zu diesen 2–8 Tage alten Ascitestumoren fiel der ATP-ase-Gehalt etwa vom achten Tag an in allen Zellen zuerst im Zytoplasma ab, dann folgten Nucleus und Nucleolus. In 12–14 Tage alten Tumoren bildeten die Nucleolen die einzigen färbbaren Zellstrukturen.

Abb. 2 zeigt eine vierkernige Zelle aus einem 9 Tage alten Tumor mit negativem Zytoplasma, wobei von dem vierten Kern nur noch der Nucleolus sichtbar ist. Das gleiche Verteilungsmuster besitzen bemerkenswerterweise auch jüngere multinukleäre Zellen. Sie haben im Gegensatz zu ihren gleichaltrigen ein- oder zweikernigen Zellen ihre zytoplasmatische ATP-ase verloren.

Daß außer Zytoplasma und Kern auch die Kernkörperchen die Fähigkeit verlieren können, ATP zu

[1] E.A. Kabat und J. Furth, Amer. J. Path. *17*, 303 (1941).

[2] L.H. Manheimer und A.M. Seligman, J. Natl. Canc. Inst. *9*, 181 (1948).

[3] H. Lettré, Z. Physiol. Chem. *268*, 59 (1941).

[1] D. Glick und E.E. Fischer, Arch. Biochem. *8*, 91 (1945). – D. Glick, *Techniques of Histo- and Cytochemistry* (Interscience Publishers, New York, 1949).

[2] G. Gomori, Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med. *42*, 23 (1939).

[3] Die ATP stammte von der Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio.

spalten, demonstriert die Riesenzelle der Abb. 3 eines 11 Tage alten Tumors, in der mit Sicherheit 15 Kerne gezählt werden konnten. Das Präparat wurde nach FEULGEN gegengefärbt, was ohne Schaden für die Gomori-Reaktion ist, wie DANIELLI und CATCHESIDE[1]

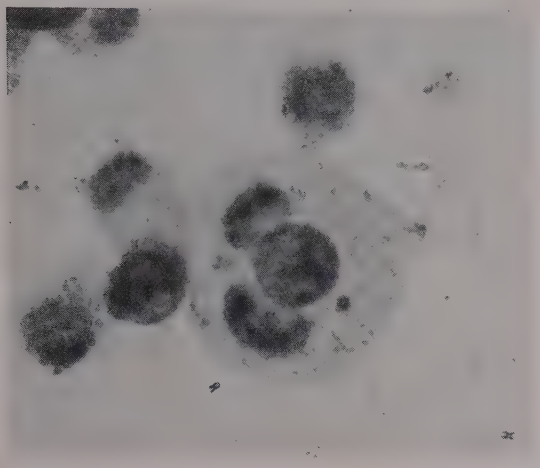


Abb. 2. Gomori-Reaktion auf ATP-ase. Mikrophotographie. Vergr. etwa 2000mal.

zeigen konnten. Während die der Riesenzelle benachbarten Zellen eine purpurbraune Kernfärbung besaßen, erschienen die Kerne bei dieser im bekannten Violett der Feulgen-Reaktion. Am oberen Rand der Zelle befindet sich ein Kern in der Metaphase, eine Beobachtung, die an multinukleären Zellen dieses Tumors oft gemacht werden kann.

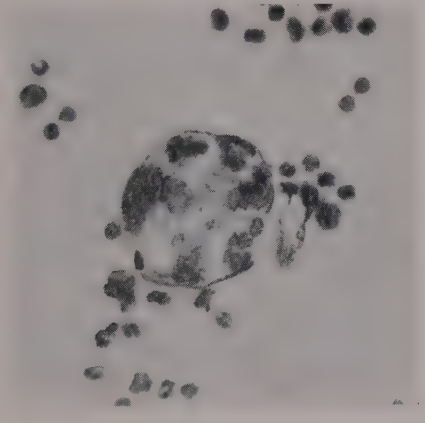


Abb.3. Gomori-Reaktion auf ATP-ase. Gegenfärbung nach FEULGEN. Mikrophotographie. Vergr. etwa 1000mal.

Bei zwei Tumoren gaben die Chromosomen eine positive Reaktion auf ATP-ase, wie die Metaphase der Abb. 4 zeigt. Die Feulgen-Reaktion bestätigte den Befund.

Wurden die Zellen in Abwesenheit von ATP unter gleichen Bedingungen behandelt, so blieben die Schwärzungen in den oben beschriebenen Strukturen aus (Abb. 5).

Diskussion. Wie gezeigt wurde, findet sich die stärkste Konzentration der ATP-ase in den Nucleoli der untersuchten Zellen, was mit den Ergebnissen von GLICK und FISCHER[1] übereinstimmt. Sie wiesen 1946 mit der von ihnen modifizierten Gomori-Reaktion einen ATP-ase-Gehalt in den Nucleoli von Weizenkeimlingen nach. Ferner stellten GLICK und LUSHBAUGH[2] in Muskeln und Ganglien von *Periplaneta americana* ATP-ase dar.

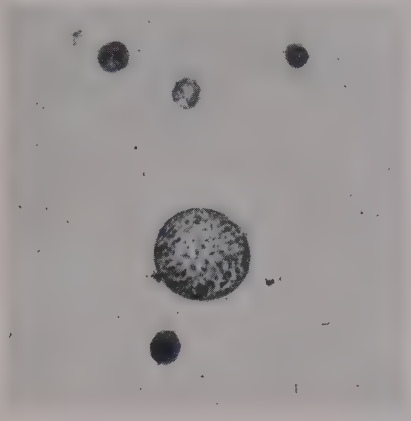


Abb. 4. Gomori-Reaktion auf ATP-ase. Mikrophotographie. Vergr. etwa 1000mal.

Die Tatsache, daß mit dem Alter der Ascitestumorzellen die ATP-ase und die RNS[3] des Zytoplasmas abnimmt und gleichzeitig die Mitoserate[3] fällt, läßt auf einen Zusammenhang zwischen ATP-ase und Zellteilung schließen.

Abb. 5. Gomori-Reaktion auf ATP-ase in Abwesenheit von ATP. Mikrophotographie. Vergr. etwa 1000mal.

Über den zytochemischen Nachweis von ATP-ase in den Chromosomen wurde noch nichts veröffentlicht, jedoch konnte alkalische Phosphatase in den Chromosomen bei Hühnerherzfibroblasten *in vitro* von WILLMER[4], von KRUGELIS in den sich entwickelnden Samenzellen des Mäusehodens[5] und in Speicheldrüsenzellen von *Drosophila*[6] und gleichfalls bei letzteren von DANIELLI und CATCHESIDE[7] nach GOMORI dargestellt werden. Daß der Nachweis der ATP-ase nur in zwei Fällen in den

[1] J.F. DANIELLI und D.G. CATCHESIDE, Nature *156*, 294 (1945).

[1] D. GLICK und E.E. FISCHER, Arch. Biochem. *11*, 65 (1946).
[2] D. GLICK und C.C. LUSHBAUGH, Science *103*, 599 (1946).
[3] C. LANDSCHÜTZ, unveröffentl. Versuche.
[4] E.W. WILLMER, J. Exptl. Biol. *19*, 11 (1942).
[5] E.J. KRUGELIS, J. Cell. Comp. Physiol. *19*, 1 (1942).
[6] E.J. KRUGELIS, Genetics *30*, 12 (1945).
[7] J.F. DANIELLI und D.G. CATCHESIDE, Nature *156*, 294 (1945).

Chromosomen gelang, könnte an dem langen Aufenthalt der Zellen in einer Flüssigkeit bei p_H 9 liegen. Hierbei kann die Chromosomenstruktur zerstört werden, worauf Moog[1] hinwies.

Herrn Prof. Lettré bin ich für seine Unterstützung und sein Interesse, das er der Arbeit entgegenbrachte, zu großem Dank verpflichtet.

Christoph Landschütz

Institut für experimentelle Krebsforschung der Universität Heidelberg[2], den 25. Januar 1950.

Summary

ATP-ase is demonstrated in the cells of ascites tumor of mice by means of the Gomori cytochemical technique modified by Glick. The concentration, which is highest in the nucleoli, is somewhat less in the nuclei, and still less in the cytoplasm. With the aging of the tumors the concentration begins to decrease first in the cytoplasm, next in the nuclei, and finally in the nucleoli.

Multinuclear cells have no ATP-ase in their cytoplasm. A multinuclear giant cell is described which is entirely free of ATP-ase.

With two tumors it has been possible to demonstrate the presence of ATP-ase in the Chromosomes.

The facts described are compared with results in the literature.

[1] F. Moog, Biol. Bull. *86*, 51 (1944).

[2] Gegenwärtige Anschrift: Institut für Virusforschung, Heidelberg.

Über den Einfluß des α-Tocopherols auf den Stoffwechsel

Die Frage nach dem Angriffspunkt des α-Tocopherols bei den durch dieses Vitamin hervorgerufenen Stoffwechselveränderungen ist noch nicht geklärt. Einige Autoren nehmen einen zentral-dienzephal-hormonalen Angriffspunkt an[1]. Markees hingegen nimmt zumindest für den Muskelstoffwechsel einen rein peripheren Angriffspunkt des Vitamins E an[2].

Uns interessierte diese Frage im Zusammenhang mit klinischen Studien über die Wirkung des Vitamins E bei Hyperthyreose. Die hiezu durchgeführten Untersuchungen hatten folgendes Ergebnis:

1. Eine durch Thyroxin erzeugte hohe Kreatinurie bei Ratten wird durch Vitamin E beträchtlich vermindert.

2. Der nach Thyroxin (nicht ganz regelmäßig) gesteigerte O_2-Verbrauch im isolierten Muskel wird durch Vitamin E nahezu immer deutlich vermindert[3].

3. Zur Prüfung der Frage, ob diese den erhöhten peripheren Sauerstoffverbrauch hemmende Wirkung nur auf die Muskulatur beschränkt ist, ließen wir Leberschnitte von Ratten, die an drei vorangegangenen Tagen je 0,5 mg/100 g Tiergewicht Thyroxin erhalten hatten, im Warburg-Apparat atmen. Der Hälfte der Tiere war außerdem zweimal je 10 mg/100 g Tiergewicht Ephynal (Hoffmann-La Roche) injiziert worden. – Wir konnten dabei keine signifikanten Unterschiede im Sauerstoffverbrauch der Leberschnitte zwischen den beiden Gruppen feststellen.

4. Als weiteren Test benützten wir die Retikulozytenkrise und die damit verbundene erhöhte Sauerstoffatmung des Blutes nach Schilddrüsenzufuhr (über Methode und Wert dieses Testes siehe[1]).

Bei gleichzeitiger Ephynalinjektion fanden wir weder eine signifikante Verminderung der Retikulozytenzahl noch eine Verminderung der Atmung der Retikulozyten an sich.

Durch diese Untersuchung ist bewiesen, daß in Übereinstimmung mit S. Markees[2] das Vitamin E eine peripher stoffwechselhemmende Wirkung auf die Muskulatur ausübt. Ein Anhaltspunkt für eine übergeordnete Steuerung der Stoffwechselwirkung des Vitamins E konnte nicht gefunden werden.

H. Braunsteiner und F. Mlczoch

II. Medizinische Universitätsklinik, Wien, den 25. Januar 1950.

Summary

The creatinuria induced by thyroxin in rats can be significantly diminished by vitamin E. The increased O_2-consumption of liver slices and of erythrocytes during reticulocyte crises of thyroxin-treated animals is not influenced by this vitamin. These experimental findings prove the peripheral metabolic activity of vitamin E, whereas a central effect on metabolism cannot be detected.

[1] H. Braunsteiner und F. Mlczoch, Wiener Z. inn. Med., im Druck (1950).

[2] S. Markees, Helv. med. acta *15*, 528 (1948).

Effetti degli alcaloidi diidrogenati del *secale cornutum* sugli edemi polmonari sperimentali da adrenalina, salicilato di metile e tiourea

Nel quadro delle ricerche che ovunque si compiono allo scopo di precisare la patogenesi dei vari edemi polmonari sperimentali mi è sembrato interessante studiare l'azione degli alcaloidi diidrogenati del *secale cornutum* sugli edemi polmonari sperimentali da adrenalina, salicilato di metile e tiourea.

Gli alcaloidi diidrogenati del *secale cornutum* (Hydergin) (diidroercocornina, diidroergocristina, diidroergocriptina) sono dovuti agli studi critico sperimentali di Stolle, Hofmann[1], e Rothlin[2]. Le complete osservazioni di Rothlin hanno accertato negli organi isolati e nel ratto una notevole attività simpaticolitica anche di fronte a concentrazioni notevoli di adrenalina. Un intervento del sistema nervoso viene spesso invocato nell'interpretazione dell'edema sperimentale da adrenalina. Del tutto oscura è invece la patogenesi dell'edema polmonare da salicilato di metile (Chatin-Guinerd[3]) e da tiourea (Richter e Clisby[4], Drinker e Jones[5], rendendo interessante lo studio dell'influenza che possono spiegare i suddetti alcaloidi su questa varietà di edemi polmonari sperimentali.

[1] C. Biddulph und R. K. Meyer, Amer. J. Phys. *132*, 259 (1941); Endocrinology *30*, 551 (1942). – P. Borman und H. A. Heinsen, Dtsch. Arch. klin. Med. *193*, 157 (1948).

[2] S. Markees, Helv. med. acta *15*, 528 (1948).

[3] H. Braunsteiner und F. Mlczoch, Wiener Z. inn. Med. Mai 1950.

[1] A. Stoll e A. Hofmann, Helv. chim. acta *26*, 2070 (1943).

[2] E. Rothlin, Helv. physiol. acta *2*, C 48 (1944).

[3] M. M. Chatin e L. Guinard, C. R. Séanc. et Soc. Biol. p. 669, 1900.

[4] P. Richter e H. Clisby, Arch. Path. *33*, 46 (1942).

[5] C. K. Drinker e S. Jones, Path. Bact. *58*, 483 (1946).

Tavola I

Edema polmonare acuto da adrenalina ed Hydergin

N° conigli	Hydergin dose	Hydergin via di somministrazione	Adrenalina mg per animale	Risultati morte e.p.a.	Risultati sopravvivenza
10	(controllo)		2 i. v.	10	—
10	0,30 mg/kg	i. v.*	2 i. v.	0	10
8	0,03 mg/kg	i. v.	2 i. v.	0	8
10	0,30 mg/kg	s. c.	2 i. v.	1	9
8	0,30 mg/kg	s. c.**	2 i. v.	7	1
8	0,30 mg/kg	s. c.***	2 i. v.	8	0

* L'Hydergin è stato iniettato i.v. 5 minuti prima dell'adrenalina.
** L'Hydergin è stato iniettato s.c. due ore prima dell'adrenalina.
*** L'Hydergin è stato iniettato s.c. tre ore prima dell'adrenalina.

Tavola II

Edema polmonare acuto da salicilato di metile ed Hydergin

N° conigli	Hydergin dose	Hydergin via di somministrazione	Salicilato metile g i.v.	Risultati morte e.p.a.	Risultati sopravvivenza
10	0,30 mg/kg	s. c.	0,30/kg	10	—
10			0,30/kg	10	—

Tavola III

Edema polmonare acuto da tiourea ed Hydergin

N° ratti	Hydergin dose	Hydergin via di somministrazione	Tiourea g	Risultati morte e.p.a.	Risultati sopravvivenza
10	0,30 mg/kg	s. c.	0,50/kg	10	—
10			0,50/kg	10	—

Dai risultati riassunti nelle tavole I, II, III, si possono trarre le seguenti conclusioni:

1° Gli alcaloidi diidrogenati del *secale cornutum* (Hydergin), preventivamente iniettati a conigli, sia per via i. v. che s. c., alla dose di mg 0,30 e 0,03 kg, proteggono gli animali 100 % dalla morte per intossicazione acuta da adrenalina. La protezione esercitata dall'Hydergin non si protrae per lungo tempo e dopo due ore la quasi totalità degli animali soccombe all'iniezione di adrenalina.

Gli animali sopravvissuti alla iniezione di adrenalina, in seguito alla protezione dell'Hydergin, hanno poi acquistato di fronte a dosi adrenalina superiori alle letali una prolungata resistenza talora sorprendente (10–15 giorni).

È interessante il fatto che anche con gli antiistaminici sintetici abbia potuto osservare nei conigli questa resistenza verso l'adrenalina ottenendo inalcuni casi, dopo parecchi giorni, la sopravvivenza anche a dosi di mg 10–15 di adrenalina. Tale resistenza risulta pertanto superiore a quella che si può ottenere per assuefazione progressiva dell'alcaloide (Abderhalden).

2° L'edema polmonare acuto *da salicilato* di metile (g 0,30 kg i. v.) nei conigli non è stato mai prevenuto dall'Hydergin alla dose di mg 0,30 kg i. v. perfettamente sufficiente per proteggere gli animali dall'e.p.a. da adrenalina.

3° L'edema polmonare e l'effusione pleurica da tiourea nei ratti (g 0,50 per 100 g) somministrato per via intraperitoneale, non sono stati influenzati dalla preventiva somministrazione s. c. di Hydergin. Come risulta inoltre da precedenti osservazioni, anche i ratti delle attuali esperienze hanno dimostrato una progressiva tolleranza verso la tiourea se questa veniva gradatamente aumentata.

Le esperienze attuali stanno a dimostrare che gli alcaloidi diidrogenati del *secale cornutum* prevengono costantemente nel coniglio l'edema polmonare acuto da adrenalina mentre si dimostrano inefficaci verso l'edema polmonare da salicilato di metile e da tiourea.

L'azione dell'Hydergin nell'edema polmonare acuto da adrenalina probabilmente si inquadra nell'azione simpaticolitica ad esso riconosciuta da Rothlin e confermata da Stone[1] a riguardo dei prodotti sintetici bloccanti gli effetti adrenergici.

Queste conclusioni tendono ad escludere che nella patogenesi ancora oscura degli edemi polmonari da tiourea e da salicilato di metile intervenga il sistema nervoso simpatico come appare invece evidente per l'edema polmonare da adrenalina.

Antonio Paolini

Istituto di farmacologia dell'Università di Roma, il 26 febbraio 1950.

Summary

In all known cases, rabbits that have been injected intravenously with dihydrogenated alkaloids of ergot and subsequently injected intravenously with 2 mg of adrenaline (d. l. 100) (irrespective of animal weight) do not manifest any sign whatever of pulmonary edema and, in fact, acquire immunity against the acute lethal intoxication normally called forth by adrenaline.

In addition, if a further similar injection of (d. l. 100) adrenaline is carried out after several days, the animals retain their immunity and still do not suffer any deleterious effects.

However, the ergot injection offers no protection against the immediate lethal effect (most striking symptom pulmonary edema) produced by a subsequent injection of tiourea (0·50 g per 100 g) and of methyl salicylate (0·30/kg i. v.).

Since it is evident that the harmful action of adrenaline is abolished by means of the adrenergic block created by the (alkaloids), it can safely be concluded that the sympathetic system does not play any decisive role in the pathogenesis of the pulmonary edema caused by the intravenous introduction of tiourea and methyl salicylate.

[1] C. A. Stone e E. R. Loew, Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. *71*, 122 (1949).

Nouveaux livres - Buchbesprechungen - Recensioni - Reviews

Lezioni di geometria moderna

Di Beniamino Segre
Vol. I
(Bologna, Zanichelli, 1948)
Lire 1200,—

È questo il primo bellissimo volume di un Trattato col quale l'eminente Geometra dell'Università di Bologna si propone di dare un assetto organico, e per quanto è possibile definitivo, a quella Geometria, bene a ragione chiamata *moderna*, in cui le «coordinate» sono «numeri», cioè elementi, di un corpo qualsiasi.

Il volume, dedicato alla Geometria proiettiva lineare, si divide in due parti.

La Parte I comprende una ricca, succosa e limpida esposizione dei preliminari algebrici: che consente una chiara intelligenza di tutto il volume anche a chi non possegga preventive cognizioni specifiche di Algebra moderna.

Dalle nozioni e proprietà elementari circa gruppi, anelli, corpi e campi, attraverso a quelle sui sottoinsiemi, in particolare sugli ideali, e sugli anelli di polinomi, si perviene ai concetti di caratteristica, campo fondamentale e centro di un corpo, e alla teoria della divisibilità fra polinomi in un dato corpo.

Ripartita in 12 paragrafi, la trattazione, che sin dall'inizio reca l'impronta di una completa rielaborazione dell'ampia materia da parte dell'Autore, termina studiando diffusamente, con le varie estensioni e aggiunzioni relative ad un corpo, i corpi finiti e i campi di Galois.

Ma è senza dubbio la Parte II, di squisita indole geometrica, che per le sue novità sostanziali o di impostazione conferisce all'opera in esame un pregio veramente singolare.

Essa si inizia (§ 13) con l'introduzione sopra un corpo γ arbitrario, anche non commutativo, degli spazi lineari: le cui proprietà fondamentali si stabiliscono con elegante originalità in modo affatto indipendente dalla teoria dei sistemi di equazioni lineari su γ: il che permette all'Autore di acquisire per via geometrica vari risultati di tale teoria. Da rilevare è pure l'utile estensione della nozione di birapporto e di gruppi armonici, seguita dalla dimostrazione della proprietà che ha ogni spazio lineare su γ di essere *desarguesiano:* valendo in esso il teorema di Desargues o dei triangoli omologici.

Il successivo § 14 verte sugli spazi, chiamati *grafici* (più generali di quelli lineari), per i quali sussistono le proprietà di appartenenza della geometria proiettiva. Premessa la definizione di spazio grafico *riducibile* (ottenibile per *composizione* da due suoi spazi subordinati) si caratterizza la irriducibilità di uno spazio grafico mediante la validità in esso del così detto Postulato di Fano, affermante che ogni retta contiene almeno tre punti.

Ogni spazio lineare sopra un corpo γ, commutativo o no, è uno spazio grafico irriducibile e desarguesiano: l'importante inversione di questo teorema, e quindi la caratterizzazione degli spazi lineari su γ entro la totalità di quelli grafici, viene ottenuta mediante speciali coordinate non omogenee, già introdotte dallo Staudt: il cui metodo geniale si espone con notevoli complementi e semplificazioni.

Lo stesso § 14 contiene, fra altro, una dimostrazione dell'indipendenza, in geometria piana, del teorema di Desargues dalle proposizioni di appartenenza della geometria proiettiva, anche se a queste si aggiunge il Postulato di Fano: invece ogni S_n grafico irriducibile di dimensione $n \geqq 3$ è desarguesiano, e quindi lineare.

I §§ 15 e 16 sono interamente dedicati agli spazi grafici irriducibili e *pascaliani:* cioè tali che per ogni loro esagono piano inscritto in una coppia di rette sussiste il teorema di Pappo-Pascal.

Uno spazio siffatto non è altro che uno spazio lineare S sopra un corpo commutativo γ. Con l'uso delle coordinate grassmanniane, e delle loro duali, si esprimono varie condizioni d'incidenza fra spazi subordinati di S. Essendo poi S' un altro spazio lineare sopra un corpo γ' isomorfo a γ, e θ un qualunque isomorfismo fra γ e γ', si introducono e si studiano (utilizzando largamente la nozione di birapporto) le collineazioni e le correlazioni fra S e S' *inerenti* a θ: che divengono omografie o reciprocità (caratterizzate dalla proprietà di conservare i birapporti) quando γ' coincide con γ e θ riducesi all'automorfismo identico.

Ad uno studio approfondito delle omografie e reciprocità involutorie in spazi sopra un corpo commutativo qualsiasi (in particolare di caratteristica 2) seguono alcuni sviluppi, interessantissimi anche per la somma eleganza e spigliatezza dei procedimenti dimostrativi, collegati a certe estensioni iperspaziali del teorema di Desargues: ad esempio sulle coppie di n-simplessi, in un S_{n-1} pascaliano, polari reciproche rispetto ad una quadrica, e sulle n-uple di rette, o di spazi S_{n-3}, in posizione di Schläfli.

Chiude il volume una ricca serie di risultati, in prevalenza di natura numerativa, sugli spazi lineari finiti (§ 17), con cenni sulle configurazioni costituite dai loro spazi subordinati.

È vivamente da augurarsi che presto l'Autore completi coi successivi volumi l'opera iniziata in maniera così eccellente e ammirevole. A. Longhi

Nuclear Forces

By L. Rosenfeld. 543 pp.
(North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1948)

Das Buch stellt die Bemühungen der theoretischen Physiker dar, aus den Erfahrungen der Kernphysik die Kräfte, die die Atomkerne zusammenhalten, theoretisch abzuleiten. Der weitere Versuch, die Kernkräfte auf ein quantisiertes Feld, das mit den Nucleonen (Protonen, Neutronen) gekoppelt ist (Mesontheorie) zurückzuführen, wird nicht näher diskutiert.

Diese Beschränkung ist begreiflich, weil sich die Mesontheorie gegenwärtig in einem sehr problematischen Zustande befindet, und schon bei den einfachsten Anwendungen auf die Kernphysik zu keiner quantitativen Übereinstimmung mit der Erfahrung führt.

Doch auch unter dieser Einschränkung ist das Bild, das wir uns heute über die Kernkräfte und über den durch sie bedingten Aufbau der Atomkerne machen können, alles andere als befriedigend.

Der Autor hat seinem Werk ein Zitat aus dem Gedicht des Parmenides als Motto vorangestellt: «Von allem sollst du nun hören, vom unbewegten Herzen der wohlgerundeten Wahrheit und von den Meinungen der Sterblichen, auf die kein Verlaß ist» und bemerkt voller Bedauern, daß sein Buch vor allem von den letzteren handle.

Desto höher muß sein Verdienst gewürdigt werden, da er den mannigfaltigen Stoff und die physikalisch oft wenig einleuchtenden theoretischen Ansätze mit größtem Fleiße übersichtlich, kritisch und doch nicht überkritisch dargestellt hat.

Das Buch ist in 4 Abschnitte geteilt, denen sich ein umfangreicher Anhang anschließt. In diesem werden vor allem neueste Forschungsergebnisse nachgetragen, so daß das Werk weitgehend den gegenwärtigen Zustand der Kernphysik wiederspiegelt.

Der erste Abschnitt handelt von den Eigenschaften der den Kern aufbauenden Teilchen sowie von denjenigen Charakteristiken des Kernbaus, die sich aus einem allgemeinen Überblick über die bekannten Atomkerne ergeben. Der zweite Abschnitt ist der Theorie des 2-Nukleonenproblems gewidmet, soweit sich dieses mit Hilfe reiner Zentralkräfte behandeln läßt.

Im dritten Abschnitt werden die Mehrkörperprobleme behandelt. Hier findet man eine Übersicht über die verschiedenen Kernmodelle und über die gruppentheoretischen Betrachtungen, die zu einer Klassifikation der Terme leichter Kerne führen.

Schließlich wird im vierten Abschnitt gezeigt, welche Gründe dazu führen, auch Nicht-Zentralkräfte (Tensorkraft) in Betracht zu ziehen.

Die Darstellung sucht stets auch einem theoretisch weniger geübten Physiker verständlich zu sein und ist daher recht ausführlich. Den Schluß des Buches bilden Tabellen über die Bindungsenergie, eventuelle Zerfallsprodukte usw. aller bekannten Kerne.

Das Werk wird jedem, der auf dem Gebiet der Kernphysik arbeiten möchte, sei es als Theoretiker, sei es als Experimentator, unentbehrlich sein. M. Fierz

---

Ins Innere von Kunststoffen, Kunstharzen und Kautschukarten

Von Erich V. Schmid
2. Auflage. 203 Seiten mit 130 Abbildungen
(Verlag Birkhäuser, Basel 1949) (sFr. 18.50)

Das schon nach kurzer Zeit in zweiter, erweiterter Auflage erschienene Büchlein kommt offensichtlich einem großen Bedürfnis entgegen. Es handelt sich, wie der Verfasser betont, nicht darum, eine rein wissenschaftliche Darstellung der Materie zu geben, aber auch nicht um eine zu populäre Schrift. Daher wird an das Fassungsvermögen des Lesers zwar keine zu große Anforderung gestellt, aber er ist doch genötigt, sich ernsthaft mit der Sache auseinanderzusetzen. Die Art, wie Schmid die Begriffe «Kohlenstoff-Doppelbindung» oder z. B. Molekül darstellt, ist ausgezeichnet und auch pädagogisch. Auch der Nichtchemiker erhält ein klares Bild über das, was bei der Bildung von großen Molekülen («Makromolekülen») eigentlich passiert. Jeder der mit den wichtigen modernen plastischen Massen und Lakken zu tun hat, begreift, mit was er eigentlich arbeitet. Somit erfüllt das kleine, aber inhaltsreiche Buch seinen Zweck, ohne je platt zu werden. Absichtlich werden die höchst komplizierten Darstellungsmethoden der vielen Ausgangsmaterialien nicht behandelt, weil das nur zu einer ganz oberflächlichen Darstellung führen würde. Dagegen werden die Prinzipien, nach denen man die vielen Polymerisationen durchführt, anschaulich auch durch Zeichnungen erläutert. Die Auswahl des großen Materials ist gut und genügt, um einen Überblick des ganzen Gebietes zu gewähren. In 15 Abschnitten werden u. a. folgende Polymere behandelt: Die Technik der Polymerisation, Eigenschaften der Fadenmoleküle, Verarbeitung der Kunststoffe, Naturkautschuk, Vulkanisation, Die Synthetischen Kautschuke, Kunststoffe aus Zellulose, Nylon, Bakelite, Aminoplaste, Anwendung der Stoffe und Lackharze.

Alles in allem darf man das Buch jedem Interessenten bestens empfehlen, weil es tatsächlich das bietet, was der Autor verspricht. H. E. Fierz-David

---

Traité de Zoologie

Anatomie, Systématique, Biologie.
Publié sous la direction de M. Pierre Grasse
(Masson et Cie, Editeur, Paris, 1948)

Das Gesamtwerk soll 17 Bände umfassen. Vorläufig liegen die Bände VI, IX und XI vor. Der Band VI enthält: Onychophoren, Tardigraden, und den Anfang der Arthropoden: Trilobiten und Cheliceraten. Band IX: Einen Teil der Insekten (Apterygoten-Coleopteren). Band XI enthält die Echinodermen sowie die Stomocirdés und Procordés. Es liegt nahe, das französische Werk mit Kükenthals Handbuch der Zoologie zu vergleichen, das leider ein Torso geblieben ist. Das französische Werk ist im Text knapper. Anderseits ist der Text sehr vielseitig, besonders durch Miteinbeziehung der Paläontologie, was eine sehr begrüßenswerte Neuerung darstellt. Das Bildmaterial ist außerordentlich reich. Auf jeden Fall bedeutet das Werk eine sehr erfreuliche Bereicherung der zoologischen Literatur. Es wird zukünftig in keiner Bibliothek fehlen dürfen.

W. v. Buddenbrock

Tratado de Fitopatología

Por Juan B. Marchionatto
537 p., 232 ilustraciones
(Ediciones Librería de Colegio, Buenos Aires 1948)

Das Buch gibt in 16 Kapiteln einen Überblick über das Gesamtgebiet der Phytopathologie. Vorausgeschickt ist ein Überblick über die Geschichte des Gebietes, dem sich 3 Kapitel über die Methoden der Phytopathologie, über Parasitismus und Immunität und Fragen der internationalen Zusammenarbeit in der Bekämpfung der Pflanzenkrankheiten anschließen.

Den Hauptteil des Buches nimmt die Darstellung der phytopathogenen Bakterien und Pilze sowie der von ihnen hervorgerufenen Krankheiten ein. Erstaunlich kurz sind demgegenüber die Virosen behandelt, was sich auch in dem Übergehen selbst der wichtigsten neueren Literatur recht nachteilig auswirkt. Es scheint, daß der Verfasser bevorzugt die argentinischen Verhältnisse berücksichtigen wollte.

Den Schluß des Buches bilden Kapitel über die vom Verfasser so genannten «physiogenen» Erkrankungen (das sind jene Krankheiten, die auf Ernährungsstörungen und sonstige Umwelteinflüsse zurückgehen) sowie über therapeutische Fragen. Hervorzuheben ist die reiche Bebilderung des Textes. Die Reproduktion der Bilder bzw. ihre photomechanische Wiedergabe läßt allerdings vielfach zu wünschen übrig.

W. Troll

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

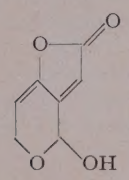
STUDIORUM PROGRESSUS

The Structure of Patulin[1]

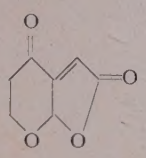
By R.B. WOODWARD and GURBAKHSH SINGH, Cambridge (U.S.A)[2]

Patulin is a mold metabolic product of the composition $C_7H_6O_4$. *It is produced by a large number of microorganisms, and possesses marked antibiotic and antifungal properties. In spite of the small size of the molecule of the antibiotic, its chemistry has turned out to be extraordinarily intricate. In 1943, a structure was proposed for the substance by* RAISTRICK, et al. *The expression deduced at that time has been generally accepted, although the possibility of the existence of patulin in tautomeric modifications of the original structure has been considered. It has long been our view that a more radical alteration of the early proposal was necessary. Recently, experimental confirmation of the necessity for such changes has been brought forward in Zürich and in Cambridge.*

In a recent letter, COHEN[3] in referring to structures proposed for patulin by us (I)[4], and by ENGEL, BRZESKI, and PLATTNER (II)[5], calls attention to the necessity



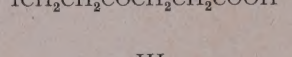
I



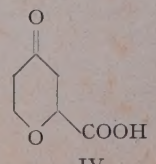
II

of showing that any structure for the antibiotic is consistent with the extensive degradative work of RAISTRICK *et al.*[6] and BERGEL *et al.*[7] (The work of the NAUTA group[8] also deserves mention.) These remarks prompt us to record our views in that direction, the more so since our structural proposal was of course based in the first instance on the elegant experiments to which COHEN refers. It will be understood that in our earlier communication, of strictly prescribed length, we had no choice but to focus our attention on the new results which we were able to bring forward in support of our conclusions.

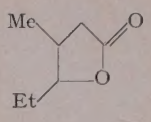
RAISTRICK *et al.*[9] obtained ε-iodo-γ-ketohexoic acid (III) by treating patulin with hydriodic acid. It was further shown that patulin was converted by hot dilute sulfuric acid to tetrahydrocomanic acid (IV) and formic acid. When hydrogenated patulin was treated with phosphorus and hydriodic acid, β-methylcaprolactone (V) and β-methylcaproic acid (VI) were formed. We consider it unnecessary to labor the



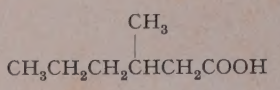
III



IV

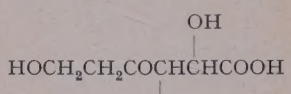


V

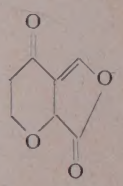


VI

point that these results prove rigorously only *that patulin is convertible in aqueous media, in the presence of acidic catalysts, to (VII), or an equivalent species.* A great many



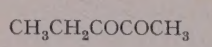
VII



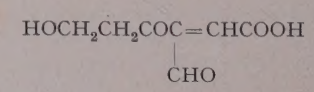
VIII

structures for patulin meet this requirement, among them, (I), (II), and the original proposal (III) of the RAISTRICK group.

We turn now to a consideration of the significance of the isolation by NAUTA *et al.*[1] of 2,3-diketopentane (IX) and carbon dioxide as products of the vigorous hydrolysis of patulin by hydrochloric acid. This result is readily explicable if it be assumed that the patulin molecule contains a double bond conjugated with the (potential) carboxyl group known to be present, i. e. that patulin is a lactone derived from (X). The hydration



IX



X

of the double bond of (X) will be expected to proceed mainly in the direction of the formation of (VII); on the other hand, activation for addition in the opposite sense is present in the —COO— group, and reaction in this alternate direction may be favored in the patulin molecule itself through modification of the carbonyl group at the other end of the double bond. Thus, to the extent that hydration of the double linkage precedes cleavage of the lactone ring, we may expect (XI) to be formed when patulin is treated with aqueous acids. Now,

[1] The manuscript is in the hands of the editor since October 14, 1949.

[2] Converse Memorial Laboratory, Harvard University.

[3] A. COHEN, Chemistry and Industry *37*, 640 (1949).

[4] R.B. WOODWARD and G. SINGH, J. Amer. Chem. Soc. *71*, 758 (1949).

[5] B.G. ENGEL, W. BRZESKI, and PL.A. PLATTNER, Helv. chim. acta *32*, 1166 (1949); *32*, 1752 (1949).

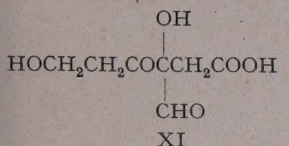
[6] H. RAISTRICK, J.H. BIRKENSHAW, S.E. MICHAEL, and A. BRACKEN, Lancet *245*, 625 (1943).

[7] F. BERGEL, A. L. MORRISON, A. R. MOSS, and H. RINDERKNECHT, J. Chem. Soc. 415 (1944).

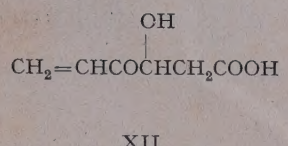
[8] W. TH. NAUTA, H. K. OOSTEHUIS, A. C. VAN DER LINDEN, P. VAN DUYN, and J. W. DIENSKE, Rec. Trav. chim. *65*, 865 (1946).

[9] H. RAISTRICK, J. H. BIRKENSHAW, S. E. MICHAEL, and A. BRACKEN, Lancet *245*, 625 (1943).

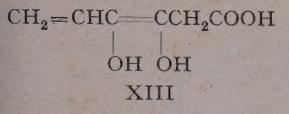
[1] W. TH. NAUTA, H. K. OOSTEHUIS, A. C. VAN DER LINDEN, P. VAN DUYN, and J. W. DIENSKE, Rec. Trav. chim. *65*, 865 (1946).



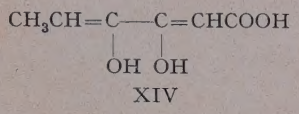
XI



XII



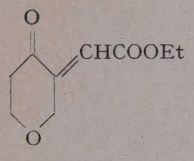
XIII



XIV

if the formyl group of (XI) is cleaved in the normal fashion, and the hydroxyl group β to the carbonyl function is lost, (XII) will be formed. A shift of the double bond system in the corresponding enol (XIII) into conjugation with the carboxyl group will lead to (XIV), from which the observed 2,3-diketopentane (IX) and carbon dioxide result by obvious processes.

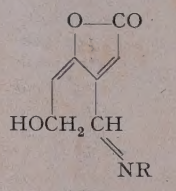
The two lactones derivable from (X) are (I) and (II). Of these, we favor (I), for these reasons: (i) there is strong positive evidence for the presence of a *bona fide* hydroxyl group in the patulin molecule in the ready formation of numerous acyl derivatives, and of a methyl ether, in the complete identity of the ultraviolet absorption spectra of patulin and its acyl derivatives, and in the presence of a strong OH band in the infra-red spectrum of patulin. (ii) The infra-red spectrum of



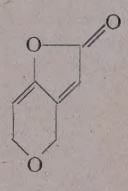
XV

patulin has no strong band at *ca.* 6μ; such a band should be present in the spectrum of (II), which contains the system CO—C=C. (iii) The ultraviolet spectrum of patulin is incompatible with the structure (II); thus, the ester (XV), containing an absorbing system closely comparable to that of (II), has $\lambda max.=240$ mμ[1]. (It should be pointed out that the ultraviolet data alone were sufficient to render the structure (VIII) for patulin unacceptable.) (iv) Addition of water to the double bond of (II) in the sense described above as necessary to encompass the formation of 2,3-diketopentane is relatively unlikely. (v) (II) contains the system —CH_2CO—, but patulin does not form a benzylidene derivative[2]. (vi) Patulin, though derived from natural sources, is optically inactive; while (I), as a hemiacetal, would be expected to racemize rapidly in solution (cf. the mutarotation of sugars, etc.), an active form of (II) would be expected to be configurationally stable. In this general connection we may call attention to the fact that the acceptance of the structure (I) implies that the various carbonyl derivatives of patulin are derived from the potential carbonyl group which in (I) is present as the above-mentioned hemiacetal function. Thus the oxime, and the phenylhydrazones of patulin may be represented as (XVI); this view is in accord with the fact that the acyl derivatives of patulin give the same compounds with carbonyl reagents as does patulin itself. (vii) Finally, the ultraviolet spectrum and the infra-red spectrum, in the double bond region, of the model lactone (XVII) prepared by us[1] are substantially identical with the corresponding properties of patulin itself.

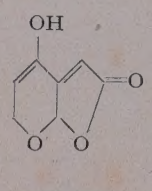
Some, but not all, of the above-mentioned defects of (II) do not obtain if it be assumed that such a molecule would exist *entirely* in the enolic form (XVIII). We see



XVI



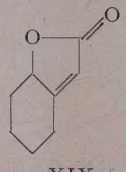
XVII



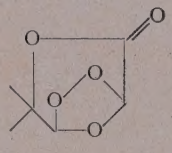
XVIII

no grounds for the acceptance of such an assumption, and beyond that, our measurements of the infra-red spectrum of patulin fail to reveal the *strong* bond at 6·0—6·1 μ which would be expected to appear in the spectrum of (XVIII), as a consequence of the presence in the molecule of the system C=C—O—R (R=H *or* alkyl)[2].

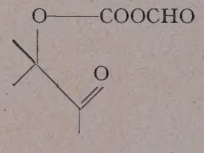
It remains to consider the structure (I) for patulin in the light of the extensive and careful experiments of the



XIX



XX



XXI

BERGEL group[3]. The formation of glyoxal from (I) on ozonization is readily understandable[4]; it may be noted that NAUTA *et al.* obtained glycolic aldehyde, as well as glyoxal[5]. The fact that no glyoxylic acid was observed as an ozonization product deserves comment. Attention may be called to the work of COCKER and HORNSBY[6], who looked for, and did not find, glyoxylic acid among the ozonization products from the lactone (XIX). It may be suggested that the ozonide of patulin suffers rearrangement in the sense (XX)→(XXI); this process would lead to the formation of formic acid and *carbon dioxide*, both of which were observed. The formation from patulin, by perhydrogenation, etc., of β-*n*-propylbutyrolactone (XXII) does not require explication; a number of paths are available, and the result in the main serves only to confirm the already well-established carbon skeleton of the antibiotic. The action of ethanolic hydrogen chloride on (I) may be expected to lead to the *pseudo* ester (XXIII).

[1] Unpublished observations from our Laboratory.

[2] F. BERGEL, A. L. MORRISON, A. R. MOSS, and H. RINDERKNECHT, J. Chem. Soc. 415 (1944). – W. TH. NAUTA, H. K. OOSTEHUIS, A. C. VAN DER LINDEN, P. VAN DUYN, and J. W. DIENSKE, Rec. Trav. chim. *65*, 865 (1946). – But compare NAUTA *et al.*, *loc. cit.*, p. 873, who state that patulin gives a benzal derivative. The substance was not analysed or otherwise characterized, and it seems very probable, from the method used, that the product obtained by the Dutch workers was chlorodesoxypatulinic acid.

[1] R.B. WOODWARD and G. SINGH, J. Amer. Chem. Soc. *71*, 758 (1949).

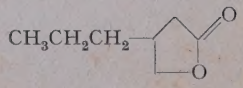
[2] Unpublished observations from our Laboratory on the spectra of dihydropyrane, and other enol ethers.

[3] F. BERGEL, A. L. MORRISON, A. R. MOSS, and H. RINDERKNECHT, J. Chem. Soc. 415 (1944).

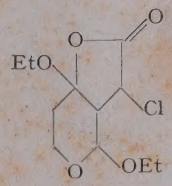
[4] Cf. BERGEL, *et al.*, *loc. cit.*, p. 417.

[5] W.TH. NAUTA, H. K. OOSTERHUIS, A.C. VAN DER LINDEN, P.VAN DUYN, and J.W. DIENSKE, Rec. trav. chim. *65*, 865 (1946).

[6] W. COCKER and S. HORNSBY, J. Chem. Soc. 1157 (1947).

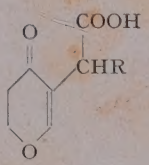


XXII

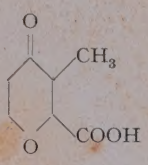


XXIII

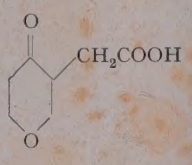
The expression is a satisfactory one in all respects for the product $C_{11}H_{17}O_5Cl$ obtained by the Bergel group. This view further implies that the chloro-acid, $C_7H_7O_4Cl$, (now known as chlorodesoxypatulinic acid[1]) obtained by the action of warm dilute sulfuric acid on (XXIII), has the structure (XXIV: R = Cl) and that the acid $C_7H_{10}O_4$, obtained by reduction of the chloroacid, and formulated by Bergel *et al.* as (XXV), is in fact the tetrahydro-γ-pyrone-3-acetic acid (XXVI). The latter de-



XXIV



XXV



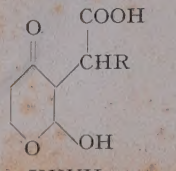
XXVI

duction has been rigorously confirmed by experiments in Zürich[1] and Cambridge[2]. (It may be noted that strong evidence against the structure (XXV) for the acid $C_7H_{10}O_4$ was long since available in the observation by the Bergel group that the substance was transformed by hydriodic acid into a *diiodo*-acid $C_7H_{10}O_3I_2$; it can hardly be doubted that (XXV) in this reaction would suffer reductive cleavage of the C—O link α to the carboxyl group, with formation of a *monoiodo*-acid $C_7H_{11}O_3I$).

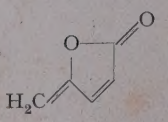
The very valuable and interesting recent degradative studies of the Plattner group[1] likewise are readily interpretable in terms of the structure (I). Thus, patulin was converted directly to the chloro-acid (XXIV: R = Cl) by the action of hydrogen chloride in *moist* ether. Further, the direct hydrogenation of patulin in *aqueous* media led to the formation of the acid (XXIV: R = H). Although a number of alternate reaction paths for these processes present themselves, the simplest involves the addition of hydrogen chloride, in the first case, or hydrogen, in the second, to the double bond which remains after hydrolytic cleavage of the lactone ring. These changes will lead to (XXVII: R = Cl *or* H), from which by obvious processes the observed products may be derived.

[1] B. G. Engel, W. Brzeski, and Pl. A. Plattner, Helv. chim. acta *32*, 1166 (1949); *id.*, *ib.* *32*, 1752 (1949).

[2] R. B. Woodward and G. Singh, J. Amer. Chem. Soc. *71*, 758, (1949).



XXVII



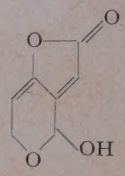
XXVIII

In view of the fact that interest in patulin first devolved from its powerful antibiotic properties, it is perhaps pertinent to point out that the structure (I) bears a strong resemblance to that of protoanemonin (XXVIII), whose antibiotic properties are well-known[1].

Few known substances contain as many reactive groupings, combined so compactly, as does patulin, and the chemistry of the antibiotic is more than ordinarily intricate. But the structure (I) is an eminently satisfactory vehicle for the interpretation of all the known facets of the chemistry of patulin, and in our view it is unquestionably correct.

Zusammenfassung

Die Erwägungen, welche die Autoren zu der Struktur I für Patulin führten, werden kurz beschrieben, und es wird gezeigt, daß das chemische Verhalten des Naturstoffes in jeder Hinsicht durch diese Strukturformel zu erklären ist.



I

[1] B. C. Seegal and M. Holden, Science *101*, 413 (1945). – H. Baer, M. Holden, and B. C. Seegal, J. Biol. Chem. *162*, 65 (1946).

Congrès

FRANCE

Le Congrès international de Microscopie électronique

aura lieu à Paris du 14 au 22 septembre 1950

Pour tous renseignements on peut s'adresser au Dr C.-A. Baud, Laboratoire de morphologie ultrastructurale et fonctionnelle, rue Ecole de Médecine, 20, Genève.